

Vol. XV, No. 2.

May, 1932

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten
SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo, YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY.

II Itchome Kagacho, Ushigome.

Price { ¥10.00 per volume, Nippon.
\$5.50 per volume, other countries.

KLINISCHE UND EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER BROMSTOFFWECHSEL.

I. Über den physiologischen Bromgehalt des Blutes und dessen Beeinflussung durch Menstruation und perorale Bromzufuhr.

VON

TEIKICHI KURANAMI.

*(Aus der medizinischen Klinik der kaiserlichen Universität zu Sapporo, Japan.
Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.)*

(Eingegangen am 14. November 1931.)

I. EINLEITUNG.

Es ist wohl bekannt, dass sich in der Natur die Halogene zwar in verschiedenen Mengenverhältnissen, aber kaum vereinzelt finden lassen. Diese Tatsache gilt aller Wahrscheinlichkeit nach auch für den tierischen Organismus. Dass aber darüber bisher sichere Ergebnisse nicht vorhanden sind, liegt vor allem an der Schwierigkeit der Methodik. In der Literatur finden wir zwar vereinzelt einige Versuchsangaben, die sich aber vielfach widersprechen, da die Versuche mit verschiedenen Methoden ausgeführt worden sind.

Wenn wir nun die Literatur in Bezug auf den Bromstoffwechsel übersehen, so fällt sehr auf, dass sich nur verhältnismässig wenige Arbeiten mit dem physiologischen Bromgehalt von Organen, Blut und Exkreten beschäftigen. Die meisten beziehen sich auf den pharmakologischen Einfluss des Broms oder stellen Beiträge zur Ausscheidung und Verteilung von zugeführten Brommengen unter verschiedenen Bedingungen dar. In Bezug auf den Bromgehalt des Blutes, den ich in dieser Arbeit zum Versuchsobjekt gewählt habe, stösst man auf erhebliche Widersprüche. Dies beruht, wie gesagt, wahrscheinlich zum Teil auf der Verschiedenheit der gebrauchten Methoden.

Wenn man die Literatur über den Halogenstoffwechsel überhaupt betrachtet, so ist der Chlorstoffwechsel am eingehendsten

untersucht worden, weil die Bestimmungsmethode dabei relativ einfach ist. Der Jodstoffwechsel, welcher mit der Schilddrüsenfunktion in sehr inniger Beziehung steht, blieb bis vor kurzer Zeit relativ wenig beachtet. Nachdem aber Fellenberg (1923) eine relativ einfache quantitative Bestimmungsmethode ausgearbeitet hatte, ist dieses Gebiet in ziemlich ausgedehnter Weise erforscht worden. In unserem Laboratorium hat Ishikawa (1927/28) zuerst den normalen Jodgehalt des Blutes bei den Japanern, und weiter dessen Beeinflussung durch die innere Sekretion ermittelt. Takasugi (1930) hat dann weiter den Jodgehalt des Blutes und den Jodstoffwechsel überhaupt bei den Beri-Beri-Kranken sehr genau untersucht und kam zu den interessanten Ergebnissen, dass der Jodgehalt des Blutes bei Beri-Beri-Kranken, bei denen die kardialen Symptome deutlich zutage treten, immer einen erhöhten Wert, aber bei solchen Kranken, die hauptsächlich über Nervensymptome klagen, einen normalen oder etwas unterschwelligen Wert zeigt, während er bei der mit Hydropsien einhergehenden Form der Krankheit zur Retention neigt.

Im Gegensatz zu diesen genauen Untersuchungen über Chlor- und Jodstoffwechsel liegen keine exakten Angaben in Bezug auf den Bromstoffwechsel vor. Ich habe mir deswegen auf Veranlassung von Herrn Prof. Nakagawa die Aufgabe gestellt, zuerst den physiologischen Bromgehalt des Blutes und weiter dessen Beeinflussung durch Bromzufuhr zu ergründen.

II. VERSUCHSTECHNIK.

Es sind zahlreiche Bestimmungsmethoden des Broms in der Literatur angegeben, deren Wiedergabe bloss historisches Interesse hätte. 1925 haben Bernhardt und Ueko eine neue Methode nach dem Guareschischen Prinzip ausgearbeitet und behauptet, dass sie damit auch eine geringe Menge von Brom im Blute zu bestimmen imstande wären. Neuerdings haben aber Pincussen und Wadim Roman (1929) eine ganz neue Mikrobestimmungsmethode des Broms veröffentlicht, mit der man Chlor, Brom und Jod mit einem und demselben Material gleichzeitig zu bestimmen vermag. Weil diese Methode mir am sichersten und einfachsten

auszuführen schien, habe ich mich in dieser Arbeit ausschliesslich der Pincussen-Romanschen Methode bedient. Während ich mich in diese Methode einzuarbeiten bemühte, habe ich es schwer gefunden, das Chloroform in einem Scheidetrichter mit kalter Kochsalzlösung zu waschen, ohne Chloroform zu verlieren. Deswegen habe ich einen mit Seitenrohr versehenen Schütteltrichter anfertigen lassen; das Seitenrohr steht gerade in der Höhe der Grenze zwischen Chloroform und Kochsalzlösung und dient zum Ausfliessenlassen der letzteren ohne Verlust von Chloroform. Seitdem ich diese Scheidetrichter in Gebrauch genommen habe, vermochte ich sicher und bequem zu arbeiten. Die anderen Geräte und Reagentien sind genau dieselben wie die von Pincussen und Roman angegebenen. Es ist hier noch zu erwähnen, dass ich bei der Bestimmung des Bromgehaltes des Blutes anfangs das Jod extrahierte, es aber nachher vollkommen vernachlässigte; der normale Jodgehalt des Blutes soll nach Untersuchungen von Ishikawa in unserem Laboratorium bei den Japanern 8–16 $\gamma\%$ betragen, und ich fand den normalen Bromgehalt des Blutes zu ungefähr 0,50 $\text{mg}\%$, worüber später genaue Zahlen angegeben werden. Wenn dem so ist, so ist der Jodgehalt im Vergleich zum Brom sehr gering; und man kann ruhig den Jodgehalt vernachlässigen, wenn er nicht durch Einfuhr von jodhaltigen Substanzen zu abnorm hohen Werten steigt. Weil ich bei den Versuchen jodhaltige Nahrung und Mittel, welche hohen Jodgehalt des Blutes veranlassen, vollkommen vermieden habe, so ist es theoretisch nicht unrichtig, dass ich die isolierte Extraktion des Jodes vernachlässigt habe. Das sparte sehr viel Zeit.

In Bezug auf die Genauigkeit der Methode selbst haben Pincussen und Roman geäussert, dass zweimal je 1 ccm einer Kaliumbromidlösung, enthaltend je 95 γ Brom bei der Analyse 95 bzw. 95 γ Brom ergaben. Weiter haben sie mit einer zusammengesetzten Lösung analysiert, die 2,9 mg Kaliumjodid, 28,15 mg Kaliumbromid, 156 mg Kaliumchlorid, etwa 5 g Zucker und etwa 5 g Casein in 100 ccm Wasser enthielt; von dieser Lösung wurden zweimal je 5 ccm zur Analyse entnommen und ergaben 942 bzw. 950 γ Brom, während darin theoretisch 945 γ Brom enthalten sind.

Nach diesen Angaben ist an der Genauigkeit der Methode kaum zu zweifeln. Als ich diese Methode nachprüfte, vermochte ich anfangs mit Kaliumbromidlösung 93 bis 95% der theoretisch errechneten Werte zu ermitteln. Seitdem ich aber später den schon oben beschriebenen, mit Seitenrohr versehenen Scheidetrichter in Gebrauch genommen habe, konnte ich fast 100% des errechneten Broms bestimmen; z. B. habe ich mit einer 1 mg Bromkalium enthaltenden Lösung 0,67 mg Brom, also 1 mg Bromkalium nachweisen können. Wenn ich Doppelbestimmungen ausführte, so konnte ich immer übereinstimmende Werte erhalten. Die in den Tabellen angegebenen Zahlen sind also die durchschnittlichen Werte der Doppelbestimmungen.

III. VERSUCHSRESULTATE.

A. *Der Physiologische Bromgehalt des Blutes bei Japanern.*

Über den normalen Bromgehalt des Blutes liegen aus dem Auslande vereinzelte Angaben vor. Wenn auch einige Autoren der Ansicht sind, das Vorhandensein von Brom im normalen Blute sei abzulehnen, so hat doch Damiens (1920) im normalen Blute geringe Mengen Brom nachgewiesen: der Vollblutwert sollte nach ihm 0,4-0,5 mg%, der Serumwert 0,6 mg% Brom betragen. Später sind Bernhardt und Ueko (1925) ebenso zu einem positiven Resultate gekommen, welches aber von dem von Damiens angegebenen etwas abweicht. Nach ihnen soll der normale Bromgehalt im Vollblute 1,0-1,5 mg% betragen. Ausser diesen wenigen Data sind uns bisher keine genauen Angaben bekannt. In Japan ist darüber noch gar keine Untersuchung gemacht worden.

Um den physiologischen Bromgehalt des Blutes zu ermitteln, muss man selbstverständlich mit aller Schärfe alle nur denkbaren Bedingungen vermeiden, welche irgendeinen Einfluss auf den Bromgehalt ausüben könnten. Deshalb habe ich in erster Linie verboten, irgendwelche Brom enthaltenden Mittel und bromhaltige Nahrung wenigstens während 5-6 Tagen vor der Untersuchung aufzunehmen. Ausserdem habe ich vorher durch Harnunter-

suchung jede irgendwie mögliche Nierenaaffektion streng ausgeschaltet; denn es ist denkbar, dass der Bromgehalt des Blutes bei einer Nierenaaffektion durch erschwerte Elimination des Broms abnorm hohe Werte zeigen könnte. Die Blutentnahmen wurden in allen Fällen morgens nüchtern ausgeführt, nachdem man die Patienten nach dem Abendessen wenigstens 15 Stunden hatte fasten lassen. Es ist hier noch zu erwähnen, dass ich bei den Frauen das Blut immer in der intermenstruellen Periode entnommen habe; denn der Bromgehalt des Blutes scheint nach meiner Untersuchung zu der Menstruation in sehr innigem Zusammenhang zu stehen, worüber später Genaueres mitgeteilt werden wird.

Wie aus der Tabelle I leicht ersichtlich ist, beträgt das Maximum des Bromgehaltes 0,66 mg%, das Minimum 0,51 mg% und der Durchschnitt 0,58 mg%.

TABELLE I.

Name	Alter	Datum (1930)	Bromgehalt d. Blutes (mg%)
T. H.	27	10/VI	0,53
T. I.	33	13/VI	0,55
T. S.	28	15/V	0,51
K. N.	30	18/VII	0,54
S. W.	20	16/VIII	0,66
H. N.	57	21/VIII	0,59
O. F.	18	7/IX	0,61
W. H.	18	7/IX	0,61
S. T.	20	7/X	0,63
X. N.	28	12/X	0,56

Maximum 0,66, Minimum 0,51, Durchschnitt 0,58

Beim weiblichen Geschlecht, dessen Resultate in Tabelle II angegeben sind, beträgt das Maximum des normalen Bromgehaltes des Blutes 0,67 mg%, das Minimum 0,51 mg% und der durchschnittliche Wert 0,57 mg%. Hieraus geht deutlich hervor, dass kein scharfer Unterschied zwischen beiden Geschlechtern wahrzunehmen ist.

Wenn man diese erhaltenen Werte mit denen von Damiens

TABELLE II.

Name	Alter	Datum (1930)	Bromgehalt d. Blutes (mg%)
M. H.	21	6/V	0,53
S. T.	22	10/V	0,58
K. N.	22	12/V	0,51
Y. U.	22	14/V	0,67
U. M.	18	20/V	0,54
M. H.	21	27/V	0,51
K. J.	23	16/VII	0,61
M. Y.	21	14/VIII	0,56
S. H.	21	7/X	0,61
S. T.	26	14/X	0,57

Maximum 0,67, Minimum 0,51, Durchschnitt 0,57

und Bernhardt und Ueko vergleicht, so wird man finden, dass die von mir erhaltenen Werte denen von Damiens sehr nahe stehen, während sie bloss die Hälfte der von Bernhardt und Ueko angegebenen betragen.

*B. Beeinflussung des Bromgehaltes des Blutes
durch die Menstruation.*

Dass der Jodgehalt des Blutes durch die Menstruation erhöhend beeinflusst wird, ist von einigen Autoren wie Veil und Sturm (1925), Maurer und Dietz (1926) behauptet worden. Ob bei dem Bromgehalt des Blutes eine ähnliche Beeinflussung besteht oder nicht, darüber liegt bisher keine einzige Angabe vor. Um dies zu untersuchen, habe ich nun den hier arbeitenden gesunden Pflegerinnen durch den ganzen Monat hindurch ab und zu Blut zur Analyse entnommen.

Wie aus Tabelle III leicht ersichtlich ist, zeigt der Bromgehalt des Blutes beim weiblichen Geschlecht deutliche Schwankungen, welche auf den ersten Blick mit der Menstruation in inniger Beziehung zu stehen scheinen. Deshalb habe ich an zwei gesunden Pflegerinnen dieses Verhalten noch genauer festzustellen versucht, indem ich das Blut mehrere Male innerhalb eines Monates entnahm. Tabelle IV zeigt uns diese Resultate.

TABELLE III.

Name	Alter	Menstruation	Datum der Menstruation u. Bromgehalt d. Blutes (mg%)			
K. N.	22	22-25/IV	2/V 0,72	12/V 0,51	26/V 0,34	
N. H.	21	8-11/V 6/VI	16/V 0,70	27/V 0,63	3/VI 0,61	6/VI 0,50
M. H.	21	29/IV-1/V 6/VI 25-28/VI		16/V 0,53	28/V 0,49	1/VII 0,90
K. S.	23	25-29/VI 26-28/VII	16/VII 0,61	23/VII 0,53	1/VIII 0,64	
M. Y.	21	3-6/VIII 13-16/IX	20/VIII 0,56	9/IX 0,48	18/IX 0,82	

TABELLE IV.

Tage nach beendeter Menstruation	M. S. 22 J.		K. K. 23 J.	
	Brom (mg%)	Bemerkung	Brom (mg%)	Bemerkung
1. T. d. Menstr.	0,42		0,39	
letzter T. d. M.	0,82		0,78	
2 T. n. d. M.	—		0,68	
3	0,72		—	
4	—		0,64	
5	0,70		—	
8	0,65		—	
9	—		0,61	
15	0,64		—	
16	—		0,61	
19	—		0,61	
22	0,59		—	
23	—		0,56	
24	—		0,53	
25	0,47	Die nächste Menstr. beginnt.	—	
26	—		—	Die nächste Menstr. beginnt.

Der Bromgehalt des Blutes steht, wie ich schon vermutete, mit der Menstruation in sehr inniger Beziehung. Man sieht, dass er während der Menstruationsperiode sein Maximum erreicht, um dann allmählich abzusinken; in der intermenstruellen Periode weist er dann ziemlich konstante Werte auf, die ich als den normalen Gehalt schon oben angegeben habe. Vor dem Beginn der nächsten Menstruation beginnt der Bromgehalt wieder zu fallen und erreicht das Minimum. Der tiefste Punkt scheint auf den Beginn der menstruellen Blutung zu fallen. Diese Schwankungen des physiologischen Bromgehaltes kann man in den beiden untersuchten Fällen in ganz ähnlicher Weise verlaufend beobachten. Daraus ist mit Bestimmtheit zu schliessen, dass der normale Bromgehalt des Blutes wie das Jod des Blutes mit der Menstruation regelmässigen Schwankungen unterworfen ist. Nach meiner Ansicht scheint er zu der ovariellen Funktion in inniger Beziehung zu stehen, worüber ich in einer der nächsten Mitteilungen berichten werde.

C. Beeinflussung des physiologischen Bromgehaltes des Blutes durch perorale Bromzufuhr.

Über dieses Thema liegen uns zahlreiche Literaturangaben vor, da die früheren Untersuchungen sich fast ausschliesslich in dieser Richtung bewegten. Wenn man nun die diesbezügliche Literatur überblickt, so wäre zu erwähnen, dass Nencki und Schoumow-Simanowsky (1894) neben den Chlorbestimmungen bei zwei Hunden die Verteilung von zugeführtem Brom auf eine Anzahl von Organen studiert haben, wobei sie zum Ergebnisse kamen, dass das Brom sich etwa in der gleichen Weise verteilt wie das Chlor. Sie machten noch darauf aufmerksam, dass bei andauernder Bromsalzzufuhr eine grosse Retention von Brom im tierischen Körper zustandekomme, und dass das Brom an die Stelle von Chlor trete, indem z.B. der Magensaft von mit Bromalkalien gefütterten Hunden fast ausschliesslich Bromwasserstoffsäure an Stelle von Salzsäure enthielt. Später hat v. Wyss (1906, 1908) die Verteilung des Broms im menschlichen und tierischen Organismus bei Extrazufuhr von Bromsalzen untersucht und kam zum Schlusse, dass sich der Körper den Bromsalzen gegen-

über durchaus passiv verhalte. Weder trete das Zellprotoplasma im Körper in feste Bindung mit dem Brom, noch komme für die Elimination aus dem Blute eine aktive Nierentätigkeit in Frage. Die Niere bleibe auch bei gesteigerter Funktion gegenüber den Bromionen indifferent. Die ausgeschiedene Menge stehe deswegen im relativen Verhältnis zur Konzentration der Bromionen in der zur Filtrierung gelangenden Flüssigkeit einerseits und zu der Menge des ausgeschiedenen Urins andererseits. Es folge daraus ohne weiteres, dass am Anfang der Bromfütterung die Einfuhr grösser sein werde als die Ausfuhr, da der Harnmenge gegenüber die Körperflüssigkeiten fast das 10 fache Volumen haben, wodurch eben die Retention im Blute zustandekomme, die demnach als ein rein passiver Vorgang anzusehen sei. Die Anhäufung der Bromionen im Blute würde bei fehlender Regulation eine Steigerung des osmotischen Druckes zur Folge haben, die aber durch Chlorausscheidung vermieden werde.

1911 hat auch Frey die Ursache der Bromretention studiert, indem er Kaninchen Natrium bromatum besonders zuführte. Nach ihm soll die Ausscheidung von Bromid so stattfinden, als sei es Chlorid; das gegenseitige Verhältnis der beiden Halogene im Harn sei das Spiegelbild ihres Verhältnisses zu einander im Blutserum; die Niere scheide wahllos von dem Brom- und Chlorbestand des Blutserums gleiche Anteile aus.

Neuerdings hat Toxopeus (1930) dieses Thema wieder aufgenommen. Er hat nämlich bei 7 Hunden die Verteilung von per os zugeführtem Natriumbromat studiert und ist zu dem Ergebnisse gekommen, dass die grössten Mengen des Broms in den Muskeln (37,3%) und weiter in der Haut (16,0%) und im Blute (9,3%) gespeichert wurden. Das ist eine ganz andere Verteilung als die des normalen, sowie des extra zugeführten Chlorids, wenn man mit den von Wahlgren (1909) und Padtberg (1910) beim Chlorstoffwechsel erhaltenen Resultaten vergleicht. Denn nach Wahlgren ist das Normalchlorid zu 35,0% in der Haut, zu 18,3% in den Muskeln, zu 17,9% im Skelett und zu 12,4% im Blute enthalten. Das extra zugeführte Chlor werde zu 28,3% in den Muskeln, zu 18,5% in der Haut, zu 10,3% im Skelett und

zu 18,6% im Darm deponiert. Weiter hat Padtberg nachgewiesen, dass die Haut im Mittel 50% des zugeführten Chlors enthielt.

Wenn man diese Literatur überblickt, so fällt es auf, dass sich die bisherigen Untersuchungen nur auf die Verteilung des zugeführten Broms in verschiedenen Organen beziehen. Es ist bisher von niemandem untersucht worden, in welcher Weise der Bromgehalt des Blutes nach Extrazufuhr von Brom auf und absteige. Es gibt zwar zahlreiche Literaturangaben, wie schon oben erwähnt, welche den Bromgehalt des Blutes nach Bromzufuhr betreffen, aber die bisherigen Untersuchungen wurden nach dem Abtöten des Tieres nur einmal am Blute ausgeführt, und nie unter Anstellung von Serienversuchen. Deswegen vermochte man auch keinen deutlichen Einblick darin zu bekommen, welchen Schwankungen der Bromgehalt des Blutes nach Bromzufuhr unterworfen wird. Ich nahm mir vor, dieses Verhalten des Bromstoffwechsels zu untersuchen. Zu diesem Zwecke habe ich zwei Personen, nachdem die erste Blutentnahme früh morgens in ganz nüchternem Zustande ausgeführt worden war, 1 g Kaliumbromat und 1 g Natriumbikarbonat einnehmen lassen und den Bromgehalt des Blutes und des Harns serienweise verfolgt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen V und VI angegeben.

Wie aus den Tabellen ersichtlich, steigt der Bromgehalt des

TABELLE V.
S. K. 28 J. Körpergewicht 41,3 kg.

Zeit	Blutbrom (mg%)	Harn			Kot
		Menge (ccm)	Brom (mg%)	absolute M. (mg)	
Vor	0,55	1200	0,14	1,68	115 g. absolute M. v. Brom 0,26 mg
1 Std.	2,62	65	3,31	2,15	
2 „	1,00	28	0,74	0,21	
5 „	0,82	105	0,35	0,37	
24 „	0,65	500	0,18	0,90	
gesamt		708		3,63	

TABELLE VI.
H. N. 57 J. Körpergewicht 37,5 kg.

Zeit	Blutbrom (mg%)	Harn			Kot
		Menge (ccm)	Brom (mg%)	absolute M. (mg)	
Vor	0,61	1600	0,48	7,68	
1 Std.	1,83	144	4,12	5,93	180 g. Bromkonzentration: 0,56 g% Gesamt brom: 1,0 mg.
3 „	1,28	72	0,96	0,70	
5 „	0,70	278	0,62	1,72	
25 „	0,63	1200	0,58	6,96	
gesamt		1649		15,31	

Blutes nach der peroralen Bromzufuhr sehr steil an und erreicht das Maximum in der ersten Stunde. Um diese Zeit beträgt der Bromgehalt im ersten Falle das 5 fache und im zweiten das 3 fache der Nüchternwerte. In der zweiten Stunde sinkt er ebenso steil ab, und in der 5 Stunde übertrifft er den Anfangswert nur in geringem Grade. Nach 24 Stunden kann man keine Vermehrung mehr bemerken.

Wenn man den Bromgehalt im Harn betrachtet, so hat die Konzentration desselben in der ersten Stunde den maximalen Wert, um danach ganz plötzlich abzufallen. In der 5. Stunde ist sie kaum mehr erhöht zu finden.

Vergleicht man die Konzentration des Broms im Blute mit derjenigen im Harn, so ist die erstere in der ersten Stunde etwas höher als die letztere, aber in den anderen Stadien beträgt die erstere fast gleich viel oder etwas weniger als die letztere. Die Gesamtmenge des innerhalb 24 Stunden in den Harn ausgeschiedenen Broms beträgt nur einen Bruchteil der eingenommenen Brommenge. Das gilt auch für den Kot. Es folgt hieraus, dass die Elimination des Broms durch die Nieren in sehr geringem Masse erfolgt, und dass die Hauptmasse im Organismus retiniert werden muss, ein Befund, der zeigt, dass die Elimination des Broms im Vergleich zu der des Chlors und des Jodes ganz anders verläuft.

IV. DISKUSSION.

Der physiologische Bromgehalt des Blutes schwankt bei unseren Landsleuten innerhalb sehr enger Grenzen. Er beträgt bei dem männlichen Geschlecht 0,51–0,66, durchschnittlich 0,58 mg% und bei dem weiblichen 0,51–0,67 mg% in der intermenstruellen Periode. Diese Zahlen stimmen mit denen gut überein, die von Damiens angegeben sind, weichen aber von den von Bernhardt und Ueko bestätigten ziemlich weit ab. Das beruht wahrscheinlich auf der Verschiedenheit der gebrauchten Bestimmungsmethode.

Es ist nun von Interesse, dass der Bromgehalt des Blutes bei dem weiblichen Geschlecht mit der Menstruation zusammen schwankt. Diese in der Literatur bisher nirgends erwähnte und von mir zuerst gefundene Tatsache ist keineswegs bedeutungslos. Während der Menstruation und zwar wahrscheinlich am Ende derselben scheint der Bromgehalt des Blutes den höchsten Wert zu haben, um dann abzufallen. In der intermenstruellen Periode bleibt er längere Zeit hindurch fast konstant. In der prämenstruellen Periode neigt er erst zum Abfallen und scheint z. Zeit der beginnenden menstruellen Blutung am tiefsten zu liegen. Er zeigt demnach wellenartige Schwankungen. Es ist nun bekannt, dass der Jodspiegel des Blutes mit der Menstruation Schwankungen unterworfen wird; die Schilddrüsenfunktion, die hauptsächlich den Jodspiegel des Blutes reguliert, steht ja zu der Menstruation in sehr inniger Beziehung. Der Befund nun, dass das Brom gerade wie das Jod den menstruellen Schwankungen unterworfen wird, beruht meiner Ansicht nach darauf, dass der Bromstoffwechsel unter dem Einfluss der inneren Sekretion steht, obwohl die Beziehung des Broms zu den Körperorganen noch nicht so klagestellt ist, wie die des Jodes zu der Schilddrüse. Untersuchungen in dieser Richtung sind im Gange, und die Resultate werden in naher Zukunft genau berichtet werden.

Was die Verteilung des Broms in den Organen nach Extrazufuhr desselben anbelangt, so ist sie von alters her eifrig untersucht worden, obwohl nicht mit sicheren Bestimmungsmethoden. Aber es ist uns noch unbekannt, wie sich der Bromgehalt des Blutes

und des Harns nach Einfuhr der Bromsalze stündlich verhalte. Wenn man meine diesbezüglichen Versuchsergebnisse betrachtet, so wird man finden, dass die Resorption des Broms sehr schnell erfolgen kann. Die Konzentration des Broms sowohl im Blute als auch im Harn erreicht schon nach einer Stunde ihr Maximum. Das Verschwinden des Bromions aus der Blutbahn scheint ebenso schnell zu erfolgen. In der zweiten Stunde ist der Bromgehalt des Blutes schon sehr niedrig.

Wie wird nun das Brom aus dem Blute verschwinden? Hier kann man zwei Möglichkeiten annehmen: erstens könnte das Brom schnell in den Harn und die Fäzes ausgeschieden, und zweitens in den Körperorganen retiniert werden. Es ist im allgemeinen bekannt, dass die anderen Halogene, wie das Chlor und das Jod, nach Extrazufuhr sehr schnell in den Harn wieder ausgeschieden werden; im Gegenteil dazu konnte ich beim Brom in beiden Exkreten nur einen sehr kleinen Bruchteil des zugeführten Broms wiederfinden. Es ist demnach kaum daran zu zweifeln, wie auch die früheren Autoren schon betont haben, dass die Bromausscheidung sehr schwer vor sich geht. Bei einmaliger Zufuhr wird das Brom fast vollkommen im Organismus fixiert. Dieses Verhalten ist ganz anders wie bei dem Chlor und dem Jod, bei denen die extrazugeführten Ionen binnen 24 Stunden fast vollständig nach ausserhalb des Körpers wieder ausgeschieden werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

Die Untersuchungen über den Bromstoffwechsel mittels der Pincussen-Romanschens Bestimmungsmethode ergaben bei unseren Landsleuten folgendes:

1. Der physiologische Bromgehalt des Vollblutes schwankt bei Männern zwischen 0,51–0,67 mg% und bei Frauen zwischen 0,51–0,67 mg% in der intermenstruellen Periode; der Durchschnittswert beträgt 0,58 bzw. 0,57 mg%. Es ist kein scharfer Unterschied zwischen beiden Geschlechtern zu konstatieren.

2. Der Bromgehalt des Blutes steht bei dem weiblichen Geschlecht zu der Menstruation in sehr inniger Beziehung; mit dem Beginn der menstruellen Blutung erreicht er das Minimum,

um während der Menstruation den höchsten Wert zu erreichen. Dann fängt er an allmählich abzufallen. In der intermenstruellen Periode bleibt er fast konstant. Er zeigt demnach auffallende wellenförmige Schwankungen.

3. Bei peroraler Zufuhr von 1g Kaliumbromat steigt der Bromgehalt des Blutes ganz plötzlich an und erreicht das Maximum nach einer Stunde. In der zweiten Stunde fällt er schon kritisch ab, und in der 5. Stunde ist ein erhöhter Wert kaum mehr zu konstatieren. Der Bromgehalt des Harns ist immer niedriger als der des Blutes, ausgenommen von dem in der ersten Stunde ermittelten, wo der erstere viel höher als der letztere ist. Die Gesamtmenge des innerhalb 24 Stunden in den Harn ausgeschiedenen Broms entspricht nur einem kleinen Bruchteil des extra zugeführten Broms. Auch in den Fäzes wird nur eine sehr geringe Menge ausgeschieden. Das einmal extrazugeführte Brom wird demnach fast vollkommen im Organismus fixiert.

Zum Schlusse habe ich die angenehme Pflicht zu erfüllen, Herrn Prof. S. Nakagawa für seine Anregung und Anleitung zu dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Ich danke auch Herrn Dr. Takasugi für seine freundliche Unterstützung während dieser Arbeit.

LITERATUR.

- Bernhardt und Ueko (1925): Biochem. Zs., **61**, 97.
 Damiens (1920): C. rend des séances de l'Academie des Sciences, **171**.
 Fellenberg (1923): Biochem. Zs., **139**, 371.
 Frey (1911): Zs. f. exp. Path. u. Ther., **8**, 29.
 Ishikawa (1927-28): Zs. der Gesellschaft für innere Medizin, **15-16** (Japanisch).
 Labat (1912): zit n. Bernhardt und Ueko.
 Mauer und Dietz (1926): M. m. W., **73**, 17.
 Nencki, Schoumow und Simanowaky (1894): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **34**, 312.
 Padtberg (1919): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **63**, 60.
 Pincussen und Roman (1929): Bioch. Zs., **216**, 336.
 Takasugi (1930): Diemedizinische Wochenschr. (Japanisch) Nr. 1258, S. 43.
 Toxopeus (1930): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **149**, 263.
 Veil und Sturm (1925): Deut. Arch. f. klin. Med., **147**, 166.
 Wahlgren (1909): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **16**, 97.
 v. Wyss (1906-08): Arch. f. exp. Path. Pharm., **55**, 263; **59**, 186

STUDIEN ÜBER GALLENSÄURENSTOFFWECHSEL.

(Begonnen und geleitet von S. Nakagawa.)

VII. Gallensekretion bei der Cholezystographie mittels des Tetrajodphenolphthaleinnatriums mit besonderer Berücksichtigung der Gallensäuresekretion.

VON

HISASHI MIKAMI.

(Aus der medizinischen Klinik der kaiserlichen Universität zu Sapporo, Japan.
Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.)

(Eingegangen am 14. November 1931.)

I. EINLEITUNG.

Tetrahalogenphenolphthaleine wie Tetrachlor- und Tetrajodphenolphthalein werden wie wohlbekannt zur Funktionsprüfung der Leber zur Zeit sehr gern praktisch angewendet, obwohl man gegen Tetrachlorphenolphthalein einwendet, dass es nicht grösstenteils in die Galle ausgeschieden werden kann. Hingegen ist man sich völlig darüber einig, dass Tetrajodphenolphthalein fast vollkommen in der Galle wiedergefunden wird. In unserem Laboratorium hat Takasugi (1930) den Jodgehalt in der Galle nach Fellenbergscher Methode quantitativ ermittelt, indem er Kaninchen Tetrajodphenolphthalein intravenös injizierte. Er kam zu dem Ergebnisse, dass der Hauptteil des Farbstoffes in die Galle, und nur ein kleiner Teil in den Harn ausgeschieden wurde.

Was den Mechanismus der Ausscheidung solcher Farbstoffe anbelangt, so ist Maruno (1928) zum Schlusse gekommen, dass das Jod wie das Chlor von den Leberzellen ausgeschieden wird, wobei sich die Sternzellen aller Wahrscheinlichkeit nach nicht wesentlich beteiligen können. Denn er hat Kaninchen die jodhaltigen Farbstoffe wie Erythrosine, Rose Bengale und Tetrajodphenolphthalein intravenös verabreicht und den Jodgehalt in der Galle ermittelt, mit dem Ergebnisse, dass die Schädigungen des

Leberparenchyms durch Phosphor, Chloroform und mechanische Quetschung verminderte Sekretion des Jodes in der Galle hervorrufen, während bei Blockierung der Sternzellen mittels Tusche keine Veränderung der Jodausscheidung bemerkt wird. Dass diese Ansicht bezüglich der Ausscheidung der Farbstoffe in die Galle überhaupt ihre Gültigkeit zu behalten imstande sei, kann nicht als völlig bewiesen betrachtet werden; die Untersuchungen in dieser Richtung haben in unserem Laboratorium zu einer etwas anderen Folgerung geführt, worüber später eingehender berichtet werden wird.

Wie verhält sich nun die Gallensekretion bei der Ausscheidung dieser Farbstoffe? Hierüber scheint sehr wenig geforscht worden zu sein, obwohl Tetrajodphenolphthaleinnatrium seit Graham und Cole in so ausgedehnter Weise bei der röntgenologischen Cholezystographie klinisch angewandt wird. Wenn man die diesbezügliche Literatur durchsieht, so wird man finden, dass nur wenige Forscher ihr Augenmerk auf diesen Punkt gerichtet haben, und zwar ohne weitgehende Untersuchungen anzustellen. So haben Graham, Cole und Copher (1925) kurz berichtet, dass das Tetrajodphenolphthaleinnatrium in der für Cholezystographie notwendigen Dosis beim Menschen eine choleretische Wirkung ausüben kann, ohne Leberschädigung hervorzurufen, und dass sich die Farbe der Galle, trotzdem Hämolyse durch diesen Farbstoff *in vivo* beobachtet wird, gar nicht verändert.

Andererseits haben Ostenberg und Abramson aus ihren Versuchen fast einwandfrei nachweisen können, dass das Tetrahalogenphenolphthalein überhaupt auf die Leber giftig einwirkt. Es rufe beim Kaninchen nekrotische Veränderung der Leber hervor; und obwohl es bei 20 cg pro kg erst eine geringgradige Veränderung der Leber zur Folge habe, so würden bei 30 mg pro kg Hämoglobin und Zylinder in den Harn ausgeschieden, wobei die Tiere endlich nach 5-8 Stunden unter Erbrechen und Lähmung zugrundegingen. Wenn man 40 cg pro kg injiziere, so trete der Tod schon in kurzer Zeit ein, und es werde in diesem Falle bei der Sektion schwere Veränderung der Leber festgestellt. Weil aber die Dosen hier sehr gross gewählt sind, kann man aus diesen Befunden allein nicht

sofort folgern, dass dieser Farbstoff in klinisch anzuwendenden Dosen auch so giftig wirken kann. Aber es scheint kaum zweifelhaft zu sein, dass er ein hämolytisches Gift ist. Bloom (1924) hat nämlich bewiesen, dass das Serumbilirubin an Hunden bei 5 mg pro kg schon zunimmt und dass sich das indirekt reagierende Serumbilirubin 24 Stunden nach der Injektion deutlich vermehrt. Kaznelson und Reimann (1925) sind zum Ergebnisse gekommen, dass das direkt reagierende Serumbilirubin bis auf das 2–6 fache zunimmt, und haben daraus geschlossen, dass das indirekt reagierende Serumbilirubin wahrscheinlich durch den Farbstoff in das direkt reagierende umgewandelt werde.

Noch genauere diesbezügliche Untersuchungen wurden neuerdings von Czike (1928) angestellt: er hat nämlich Menschen und Kaninchen das Tetrajodphenolphthaleinnatrium intravenös injiziert und den Bilirubinwert des Serums nach van den Bergh ermittelt. Nach ihm soll das Bilirubin schon nach 40–50 Minuten zunehmen und nach 12–14 Stunden sein Maximum erreichen, um nach 36–48 Stunden wieder zur Norm zurückzukehren. Das Bilirubin sei hierbei indirekt reagierend und werde nie in den Harn ausgeschieden. Ausserdem sei Herabsetzung der Resistenz der Erythrozyten zu bemerken, und die Hämolyse im Plasma nach 30–60 Minuten wahrzunehmen, welche auch *in vitro* nachgewiesen werden könne. Aus diesen Befunden hat er geschlossen, dass sich das Serumbilirubin durch die hämolytische Wirkung des Farbstoffes vermehre.

Wenn man diese Literatur durchsieht, so ist kaum daran zu zweifeln, dass das Tetrajodphenolphthaleinnatrium in grösserer Dosis als ein Lebergift wirken kann. Wie sich aber die Gallensekretion, insbesondere die Sekretion des Bilirubins und der Gallensäure dabei beeinflussen lässt, ist uns noch nicht klar bekannt. So schien es mir von Interesse zu sein, die Beeinflussung der Gallensäuresekretion zu untersuchen, zumal das Tetrajodphenolphthaleinnatrium heutzutage klinisch gern zur Cholezystographie angewendet wird.

II. EXPERIMENTELLES.

Die Versuche wurden alle an Gallenblasenfistelhunden ausgeführt. Die Ernährung, die Vorbereitung der Tiere und die Bedingungen der Versuche waren genau gleich den in der vorigen Mitteilung angegebenen. Die Gallensäure wurde nach Nakagawa und Fujikawa (1930), und das Bilirubin nach Kumekawa (1926) quantitativ ermittelt.

Beim Menschen werden gewöhnlich für die röntgenologische Cholezystographie 5 g Tetraiodphenolphthaleinnatrium intravenös injiziert. So wird pro kg ungefähr 0,1 g verabreicht. Ich habe deswegen auch Hunden 0,1 g des Farbstoffes pro kg intravenös injiziert. Das erhaltene Ergebnis ist in Tabelle I dargestellt.

Die Gallenmenge vermehrt sich sofort nach der Injektion in geringem Masse, um von der dritten Stunde an allmählich wieder zu sinken; trotzdem behält die Gallenmenge noch längere Zeit einen ziemlich hohen Wert. Der Farbstoff scheint also eine wenn auch geringgradige, choleretische Wirkung auszuüben.

Die Konzentration des Bilirubins sinkt kritisch nach der Injektion des Farbstoffes; das Minimum wird anderthalb Stunden nach der Injektion erreicht. Daran anschliessend steigt sie allmählich an, und von der 5. Stunde an wird sie sogar konzentrierter als am Anfang. Wenn man die Bilirubinausscheidung nach ihrer absoluten Menge betrachtet, so ist sehr auffallend, dass das Bilirubin direkt nach der Injektion merkwürdig stark abnimmt, und dann allmählich wieder anzusteigen beginnt. Von der 7. Stunde an vermehrt sich das Bilirubin auffallend stärker als bei den Kontrollwerten. Diese Zunahme scheint längere Zeit anzudauern, ist aber am nächsten Morgen nicht mehr zu bemerken. Es ist hier noch zu erwähnen, dass die ausgeschiedene absolute Bilirubinsmenge nach der Injektion etwa verdoppelt ist, obwohl sie im Anfangsstadium auffallend herabgedrückt wird.

Das Serumbilirubin nimmt nach der Injektion deutlich zu; die Menge war aber mit der Kumekawaschen Methode nicht zu messen. Erst 7,5 Stunden nach der Injektion wurde die Bilirubinreaktion negativ. Es stellt sich damit heraus, dass die Hyper-

TABELLE I.

20% Tetraiodphenolphthaleinnatrium-Lösung 1 cem intravenös (2,0 g)

Hund: 20 kg

Nr.	Zeit (Std.)	Galle (cem)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Serum- Bilirubin
			mg %	abs. M. (mg)	mg %	abs. M. (mg)		
1	—1,0	4,4	72,0	3,2	1400	61,6	19,4	—
2	—0,5	4,4	72,0	3,2	1400	61,6	19,4	
3	0,5	5,3	38,6	2,0	1200	63,3	31,0	—
4	1,0	5,5	7,7	0,4	1180	64,9	152,7	
5	1,5	5,4	7,7	0,4	1200	64,8	153,6	+
6	2,0	5,0	12,0	0,6	1180	59,0	98,3	
7	2,5	5,0	22,0	1,1	1140	57,0	51,8	+
8	3,0	5,0	25,3	1,3	1190	50,5	45,8	
9	3,5	4,6	39,0	1,8	970	45,1	24,8	+
10	4,0	4,4	48,0	2,1	952	41,9	19,8	
11	4,5	4,2	56,0	2,3	922	39,7	16,4	+
12	5,0	4,0	84,0	3,4	900	36,0	10,7	
13	5,5	3,8	92,8	3,5	900	34,0	9,6	+
14	6,0	3,7	104,0	3,9	892	33,9	8,5	
15	6,5	3,6	112,0	4,0	840	30,2	7,5	+
16	7,0	3,6	118,8	4,3	802	28,8	6,7	
17	7,5	3,6	140,0	5,0	825	29,7	5,8	—
18	8,0	3,6	156,0	5,6	840	30,2	5,3	
19	8,5	3,5	163,9	5,7	970	30,4	5,3	—
20	9,0	4,6	144,0	6,6	895	36,5	5,5	
21	9,5	4,6	154,0	7,1	922	42,4	5,9	—
22	24,0	3,4	93,3	3,2	1350	44,5	14,4	
23	24,5	3,3	94,9	3,1	1380	44,5	14,6	—
24	25,0	3,3	44,6	3,1	1380	45,5	14,6	
25	48,0	3,4	96,0	3,3	1980	67,3	20,6	—
23	48,5	3,4	96,0	3,3	1980	67,3	20,6	

bilirubinämie durch das Tetraiodphenolphthaleinnatrium hervorgerufen wird, woraus sich die vermehrte Ausscheidung des Bilirubins leicht erklären lässt.

Die Konzentration der Gallensäure vermindert sich allmählich, um in der 7. Stunde das Minimum zu erreichen. Was die absolute Menge derselben anbelangt, so ist sie bis 3 Stunden nach der Injektion fast ebenso gross wie vorher. Aber von dieser Zeit an nimmt sie auffallend ab, um in der 7. Stunde ihr Minimum zu erreichen. Obwohl sie dann allmählich wieder anzusteigen beginnt, so wird sie doch nach $9\frac{1}{2}$ Stunden noch deutlich erniedrigt gefunden. Selbst am nächsten Morgen ist noch eine Erniedrigung festzustellen, und erst am übernächsten Morgen wird die vollkommene Erholung der Gallensäuresekretion wahrgenommen.

Wenn man diese Veränderung der Gallensekretion von den Quotienten zwischen den beiden Hauptbestandteilen der Galle (Gallensäure/Bilirubin) aus betrachtet, so ist es von Interesse, dass sie direkt nach der Injektion eher in steiler Linie ansteigt, um dann allmählich auffallend abzunehmen. Diese Verminderung der Quotienten erreicht den Kontrollwert erst am übernächsten Morgen. Mit anderen Worten: wir haben es hier mit einer sehr deutlichen Dissoziation zwischen Bilirubin- und Gallensäuresekretion zu tun. Es ist noch zu erwähnen, dass die Gallensäuresekretion im Anfangsstadium, obwohl Bilirubin in sehr vermindertem Masse ausgeschieden wird, doch noch unbeeinflusst weitergeht.

Ich habe dann die injizierte Menge des Farbstoffes viel kleiner gewählt; es wurden nur 0,025 g pro kg intravenös verabreicht. Das diesbezügliche Resultat ist in Tabelle II angegeben.

Wie man aus Tabelle II klar ersieht, ist die Beeinflussung der Gallensekretion viel schwächer ausgeprägt. Die choleretische Wirkung und die initiale Verminderung der Bilirubinmenge mit nachfolgender Vermehrung sind deutlich wahrzunehmen. Was aber die Gallensäure anbelangt, so verhält sie sich etwas anders. Sie erfährt durch den ganzen Verlauf des Versuches fast keine Verminderung. Die Quotienten steigen im Anfangsstadium an, um nachher etwas abzunehmen. Wir haben hier eine deutliche Dissoziation vor uns. Das Serumbilirubin wird deutlich vermehrt festgestellt, was bedeutet, dass der Farbstoff selbst in so viel kleinerer Dosis doch die Hämolyse hervorzurufen imstande ist. Weil diese Beeinflussungen aber sehr geringgradig sind, so geht

TABELLE II.

Hund: 20 kg. 10% Tetrajodphenolphthalein-Na. 0,5 ccm intrav.

Nr.	Zeit (Std.)	Galle (ccm)	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Serum- Bilirubin
			mg %	abs. M. (mg)	mg %	abs. M. (mg)		
1	—1,0	2,9	108,0	3,1	1087	52,4	16,7	
2	—0,5	3,0	108,0	3,2	1785	52,9	16,5	—
3	0,5	4,1	60,0	2,5	1350	55,3	27,5	
4	1,0	4,3	60,0	2,6	1425	61,2	23,7	—
5	1,5	4,6	52,5	2,4	1250	57,5	21,9	
6	2,0	5,3	70,0	3,7	1040	55,1	15,0	
7	2,5	4,9	66,0	4,4	1210	55,6	12,6	+
8	3,0	4,5	104,0	4,7	1260	52,4	12,1	(unmessb.)
9	3,5	4,8	112,0	4,3	1300	49,4	11,6	
10	4,0	3,9	108,0	4,2	1300	50,7	12,0	
11	4,5	4,0	104,9	4,2	1337	53,5	12,7	+
12	5,0	3,9	104,0	4,1	1425	55,7	13,7	(unmessb.)
13	5,5	3,9	101,2	3,9	1487	58,0	14,6	
14	6,0	3,8	99,6	3,8	1512	55,4	15,1	
15	6,5	3,7	97,0	3,6	1537	56,8	16,0	+
16	7,0	3,6	93,2	3,4	1530	55,0	16,3	
17	7,5	3,8	84,0	3,2	1395	52,0	16,6	
18	8,0	4,1	73,7	3,0	1230	50,4	16,7	—
19	8,5	3,7	84,0	3,1	1395	51,6	16,6	
20	9,0	3,7	84,0	3,1	1395	51,6	16,6	—

die Erholung der veränderten Sekretion schnell vor sich und schon nach 7 Stunden ist nichts Abnormes mehr wahrzunehmen.

III. DISKUSSION.

In dieser Arbeit habe ich beabsichtigt, den Einfluss der Cholezystographie mittels Tetrajodphenolphthaleinnatriums auf die Gallensekretion zu untersuchen und zwar unter Anstellung von Serienversuchen.

Der in Frage stehende Farbstoff ist, in einer klinisch gebrauchten Dosis injiziert, imstande, auffallende Veränderungen der

Gallensekretion hervorzurufen. Er hat nämlich wenn auch nicht intensive, so doch auffallende choleretische Wirkung. Die Bilirubinsekretion scheint direkt nach der Injektion während etwa 2–4 Stunden stark herabgedrückt zu werden. Im Anschluss an dieses Stadium setzt sich die vermehrte Ausscheidung desselben fort, um dann allmählich wieder zum Kontrollwert zurückzukehren. Diese veränderte Sekretion dauert verschieden lang: je grösser die injizierte Farbstoffmenge ist, desto längere Zeit beansprucht die Erholung der veränderten Sekretion. Diese vermehrte Sekretion des Bilirubins im zweiten Stadium kommt sicher daher, dass der Farbstoff *in vivo* eine Hämolyse hervorruft: eine nach der Injektion wahrnehmbare Hyperbilirubinämie beweist das klar. Denn, wenn man die Gesamtmenge des nach der Injektion ausgeschiedenen Bilirubins zusammenrechnet, so findet man eine auffallende Vermehrung im Vergleich zur Kontrolle.

Was die Sekretion der Gallensäure anbelangt, so ist bei der kleineren Dosis des Farbstoffes keine Veränderung wahrzunehmen, aber bei der grösseren, klinisch gebrauchten Dosis kann man die Verminderung der Gallensäure nicht übersehen. Es ist aber erwähnenswert, dass die Verminderung der Bilirubin- und Gallensäuresekretion nicht in gleichem Schritte aufzutreten pflegt. Im Anfangsstadium, wo das Bilirubin auf ein Minimum herabgedrückt wird, bleibt die Gallensäuresekretion noch unverändert erhalten. Erst im nächsten Stadium, wo das Bilirubin sich merklich zu vermehren beginnt, fängt die Gallensäure an, allmählich herunterzusinken. Wir haben also eine sehr deutliche Dissoziation zwischen Bilirubin- und Gallensäuresekretion vor uns. Die Quotienten der beiden Hauptbestandteile der Galle steigen im Anfangsstadium sehr auffallend an, um nach dem zweiten Stadium merklich herunterzusinken.

Diese initiale Verminderung der Bilirubinsekretion hat uns äusserst interessiert; denn wir hatten in ausgedehnten Untersuchungen in unserem Laboratorium, wo verschiedene auf die Gallensekretion einwirkende Substanzen untersucht worden sind, niemals Gelegenheit gehabt, ein solches Phänomen wahrzunehmen. Einen ähnlichen Fall hat aber Fujikawa (1931) in unserem

Laboratorium beobachtet: er hat nämlich Gallenblasenfistelhunden Salvarsan in einer Dosis von 0,3–0,6 g intravenös injiziert, und dabei gefunden, dass sich das Bilirubin im Initialstadium direkt nach der Injektion deutlich vermindert, sich in der Folge aber wieder vermehrt. Wie ist nun dieses interessante Phänomen zu erklären?

Das Tetrajodphenolphthaleinnatrium wird wie wohl bekannt hauptsächlich in die Galle ausgeschieden, und die Ausscheidung geht sehr prompt und in grosser Konzentration vor sich. Die im Initialstadium sezernierte Galle färbt sich äusserst intensiv rot. Wenn sich die Leber mit maximaler Kraft ihrer Ausscheidungsfunktion bemüht, das Tetrajodphenolphthaleinnatrium aus dem Blute zu beseitigen, so wird es möglich sein, dass die Bilirubinssekretion vorübergehend aufgehalten werden kann. Demzufolge tritt eine initiale Verminderung des Bilirubins ein, während die Gallensäure noch in unverändertem Masse sezerniert werden kann. Wir haben zur Zeit keinen Beweis dafür, dass diese Annahme absolut richtig sei. Um dies zu beweisen, müsste man mit anderen Farbstoffen prüfen, die hauptsächlich und in grosser Konzentration in die Galle ausgeschieden werden können. Leider stehen uns keine solchen geeigneten Farbstoffe zur Verfügung; es gibt zwar zahlreiche Farbstoffe, welche reichlich und prompt in die Galle ausgeschieden werden, aber es ist uns ganz unbekannt, wie aus solchen Farbstoff-Galle-Gemischen das Bilirubin isoliert bestimmt werden könne. Deswegen muss die Lösung dieser Frage künftigen Untersuchungen vorbehalten werden.

IV. ZUSAMMENFASSUNG.

Wir haben Gallenblasenfistelhunden Tetrajodphenolphthaleinnatrium intravenös verabreicht und die Gallensekretion untersucht mit folgenden Ergebnissen:

1. Der in Frage stehende Farbstoff besitzt eine wenn auch nicht kräftige, so doch langdauernde choleretische Wirkung.
2. Das Bilirubin erfährt eine deutliche Verminderung im Anfangsstadium mit nachfolgender Vermehrung.
3. Diese Vermehrung des Bilirubins beruht wohl auf der

hämolytischen Fähigkeit des Farbstoffes: das Blutserum zeigt vorübergehende Hyperbilirubinämie.

4. Die Gallensäuresekretion wird deutlich vermindert: die Gallensäure ist wohl im Anfangsstadium kaum beeinflusst, vermindert sich aber im zweiten Stadium des Versuches in auffallender Weise.

5. Die Sekretion des Bilirubins und der Gallensäure wird nicht in gleichem Masse beeinflusst, sondern vollkommen dissoziiert.

6. Wir sind also imstande, durch das Tetraiodphenolphthaleinnatrium eine deutliche Dissoziation hervorzurufen.

LITERATUR.

Czike (1926): Deut. Arch. f. Klin. Med., **162**, 292.

Bloom (1924): Arch. of intern. Medicine, **4**, 446.

Fujikawa (1931): Zs. der Hokkaido mediz. Gesellschaft (japanisch), **9**, 1771.

Graham, Cole and Copher (1925): J. of A. M. A., **84**, 14.

Kaznelson und Reimann (1926): Klin. W., **4**, 1390.

Kumekawa (1926): Zs. der Tokyo med. Gesellschaft (japanisch) **40**, 805.

Maruno (1928): Jikken-Shokakibyogaku (japanisch), Bd. 3, No. 7, S. 1.

Mikami (1932): diese Zs. (im Druck).

Nakagawa und Fujikawa (1930): diese Zs., **12**, 399.

Ostenberg und Abramson, zit. n. Czike.

Takasugi (1930): Zs. der Hokkaido med. Gessellschaft (japanisch), **8**, Nr. 12, S. 1.

ÜBER DEN EINFLUSS DER LEBERSCHÄDIGUNGEN AUF DIE SERUMLIPASE.

VON

T. KAMEO.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama)
und der I. medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. R. Kaneko)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-
Universität zu Fukuoka, Japan.)*

(Eingegangen am 24. November 1931)

EINLEITUNG.

Bezüglich des Ursprungs der Serumlipase finden wir in der Literatur die Angaben von Hanriot (1896) und Arthus (1902), denen zufolge Unterschiede zwischen Blutlipase und Pankreaslipase bestehen. Hess (1911) nahm die totale Exstirpation des Pankreas oder Unterbindung der Gänge vor und stellte fest, dass der Blutlipasegehalt dabei unverändert blieb. Daraus schloss er, dass die Lipase nicht aus dem Pankreas stammen könne. Im Gegensatz dazu fand Hiruma (1924) nach der Pankreasunterbindung eine Vermehrung der Serumlipase und weiter, dass die V. pancreaticoduodenalis mehr Lipase enthielt als anderes Blut, und folgerte, dass die Serumlipase doch aus dem Pankreas stammen müsse.

Bergel (1921) behauptete, dass die Serumlipase von den Lymphozyten stamme, demgegenüber aber stehen die Ansichten von Aschhoff (1922) u. a. Andere Autoren haben die Herkunft der Serumlipase auf die Milz und Lunge, wieder andere auf ausgeschwemmte Organfermente zurückgeführt. Irie (1926) ist der Ansicht, dass die Serumlipase der Leber entstamme.

Verschiedene Autoren, wie Rona (1914), Simon (1924), Brockmyer (1924) u. a. haben je nach dem Verhalten der Lipase gegenüber verschiedenen chemischen Agentien und den Unterschieden in der optimalen Ph verschiedene Lipase-Systeme aufgestellt, indessen sollen nach den eingehenden Studien von Willstätter (1924) derartige Unterschiede auf den Einfluss von Begleitstoffen der Lipase zurückzuführen sein. Demnach ist es

also schwer verschiedene Lipasen zu unterscheiden. Willstätter unterschied Substrate der Lipasen der Leber und des Pankreas und sagte weiter, dass bei gewissen Substanzen z. B. Protein und gallensauren Salzen die Wirkung der Lipase von der Verschiedenheit des Mediums abhängig sei. Bayer (1919) u. a. fanden einen gewissen Zusammenhang zwischen der Serumlipase und den endokrinen Drüsen, aber bezüglich der Beziehungen zwischen den Serumlipase-Werten und verschiedenen Krankheiten gehen die Angaben verschiedener Autoren weit auseinander.

Verf. hat nun zu erforschen gesucht, ob Leberfunktions-schädigungen auf die Serumlipase irgendwelchen Einfluss haben, um damit festzustellen, welchen Ursprungs die Serumlipase ist und welche funktionelle Bedeutung sie hat. Um Leberschädigungen hervorzurufen, wurden zwei Methoden gebraucht, nämlich Hepatotoxininjektion und Röntgenbestrahlung.

A. Hepatotoxinversuch.

I. In der Frage, ob das Hepatotoxin leberschädigend wirkt und organspezifisch ist, stimmen die Anschauungen der Forscher noch nicht überein. Viele Autoren betonen seine Wirkung bei Störungen des Kohlehydrat- und Eiweissstoffwechsels, der immunochemischen Funktionen usw. Nur Oyama (1924) stellt sich dieser Auffassung entgegen.

Um nun festzustellen, ob das Hepatotoxin wirklich leberschädigend wirkt, wie sich in solchem Falle die Serumlipase verhält und ob nicht wenigstens zwischen letzterer und der Leber ein gewisser Zusammenhang besteht, habe ich die nachstehenden Versuche unternommen.

II. DARSTELLUNG DES HEPATOTOXINS.

a) In der Literatur wird bisher angegeben, dass es zur Herstellung eines Hepatotoxins genüge, die Leberemulsion eines Tieres einem anderen Tiere einzupflegen und das von diesem erhaltene Serum als Hepatotoxin anzuwenden. Hier müssen wir allerdings bei Anwendung der Tiere, von denen wir das Antigen entnehmen, eine bestimmte Grenze ziehen. Nachdem Forsman (1911) das

Forsman'sche Antigen entdeckte, haben andere Autoren dieses nicht nur bei Meerschweinchen, sondern auch bei Ziegen, Hunden, Pferden, Katzen usw. und zwar nicht nur in Organen, sondern auch in Geweben nachgewiesen und die Tiere, bei denen es nachgewiesen werden konnte, den Meerschweinchen-Typ genannt, während die, bei denen es nicht nachgewiesen werden konnte, zum Kaninchen-Typ gerechnet werden. Dass Kaninchen, Menschen, Affen, Gänse usw. zu dem letzteren Typ gehören, ist bekannt.

Wenn man nun verschiedenen Tieren Organemulsion des Meerschweinchen-Typs injiziert und die pathologischen Veränderungen untersucht, bzw. Funktionsprüfungen unternimmt, so entsteht neben dem spezifischen Antikörper auch der sog. Forsman'sche Antikörper, und es werden dann sicherlich auch ausser dem von der Impfung direkt betroffenen Organ auch verschiedene andere Organe beeinflusst werden.

Da weiterhin in dem bei Wiederholung des gleichen Verfahrens erhaltenen Antiserum auch andere, nicht spezifische Substanzen enthalten sein werden, dürfte es unrichtig sein, dieses Serum zu Funktionsprüfungen anzuwenden. Diese Tatsache ist von Forsman, u. a., festgestellt worden, anderseits hat Yamada gefunden, dass bei Impfung von Meerschweinchen mit den Blutkörperchen von Ziegen die hämolytische Kraft schwächer ist, als wenn Kaninchen damit geimpft werden. Zur Herstellung des Antigens hat der Verf. solche Tiere ausgewählt, die das Forsman'sche Antigen nicht haben (Kaninchen) und zur Impfung solche Tiere, die nicht zum Kaninchen-Typus, sondern zum Meerschweinchen-Typus gehören (Hunde).

b) *Darstellung des Antiserums.*

Gesunde Kaninchen wurden durch Durchschneiden der Carotis getötet. Dann wurde sofort mit auf Körpertemperatur erwärmter physiologischer Kochsalzlösung von der Pfortader aus unter geeignetem Druck die Leber ausgespült, bis die ausgespülte Flüssigkeit ganz klar wurde. Weiter wurden dann die Leber exstirpiert, das grobe Gewebe und die Blutgefässe usw. möglichst entfernt, in der Reibschale zerrieben, das Fünffache an NaCl-Lösung hinzu-

gefügt, durch sterile Gaze filtriert und das Filtrat sofort intraperitoneal gesunden Hunden injiziert.

Das Antigen wurde in einer allmählich steigenden Dosis von 20–80 ccm mit 5–7 täglichen Intervallen im Ganzen 8–12 mal injiziert und dann 7–9 Tage nach der letzten Injektion, während die Hunde eine Hungerzeit durchmachten, das Blut entnommen, zentrifugiert, und das Serum isoliert. Dieses wurde dann in einer sterilen Ampulla verschlossen und im Eisschrank aufbewahrt. Das oben beschriebene Verfahren wurde vollständig aseptisch durchgeführt. Da bei Injektion von grossen Mengen Antigen die Tiere immer schwächer wurden und schliesslich eingingen, so habe ich die Injektionsmenge dem Körperzustande des Tieres angepasst und in jedem einzelnen Falle entweder vermehrt oder vermindert.

III. METHODISCHES.

Es wurden gesunde Kaninchen verwendet und das Blut früh morgens während der Hungerzeit entnommen. Sodann wurde das Serum vom Blute getrennt und gleich darauf nach der Tributyrin-Methode von Rona und Michaelis (1911) die Lipasebestimmung vorgenommen. Zur Bestimmung der Oberflächenspannung diente der Apparat von DuNöny (1926).

Die Untersuchung erfolgte bei 20–30°C im Thermostaten (Luft) und die Werte wurden sofort nach der Mischung und nach 30–60–90–120 Minuten gemessen, doch sind in der Tabelle nur die Werte für 120 Minuten wiedergegeben, und der Lipasewert ist durch die Zunahme der Oberflächenspannung (der Wert nach 120 Minuten—sofort nach Mischung) repräsentiert. Das Reaktionssystem war das folgende:

	Kaninchen.	Menschen.
Blutserum	0.1	0.5
M/3 Phosphatpuffer Ph 7.72	1.0	2.0
Gesättigte Tributyrinlösung	25.0	25.0
Temperatur	30°C	20°C.

IV. RESULTATE.

1. Die individuelle Verschiedenheit der Lipasewerte ist bedeutend, wie die Tabelle Ia zeigt.

TABELLE I a.
Die Lipasewerte von normalen Kaninchen.
(Versuchs-Temp. 30°)

Nr.	Geschlecht	Körpergewicht (g)	Lipasewerte (d. e.)
1	♀	2190	16.76
2	♂	1910	18.15
3	♂	2100	17.10
4	♂	1920	10.72
5	♂	1650	8.14
6	♂	1900	13.74
7	♂	2420	12.01
8	♂	2155	11.41
9	♀	2274	13.30
10	♀	2145	6.86
11	♀	1890	13.30
12	♂	1825	11.59
13	♀	2040	9.88
14	♀	1955	11.17
15	♂	2110	13.14
16	♀	1950	10.30
17	♀	2015	9.45
18	♀	1890	10.13
19	♀	1870	9.26
20	♂	1600	9.87
21	♀	1835	9.58
22	♀	2300	8.32
23	♀	2145	8.75
24	♀	1730	9.02
25	♀	1720	5.57
26	♀	2100	6.43
27	♀	2750	10.04
28	♀	2050	10.38
29	♀	2070	8.58
30	♀	1865	9.02

Aber die täglichen Schwankungen der Serumlipase von normalen Kaninchen sind geringfügig wie die Tabelle Ib zeigt.

TABELLE Ib.
Tagsschwankungen der Lipasewerte von normalen Kaninchen.

Nr.	Geschlecht.	Körper- gewicht. (g)	Lipasewerte am folgenden Tage.		
			1	2	3
31	♂	2790	16.00	15.90	15.60
32	♂	2765	17.20	17.20	16.80
33	♂	2875	15.45	15.45	15.45

2. Hepatotoxinversuche.—(Tabelle II). Ich habe möglichst starke Dosen Hepatotoxin in zwei bis dreitägigen Intervallen 2–3 mal in die Ohrvenen injiziert. Alle 2 Fälle verliefen gleichmässig, d.h. vom 2. Tage ab nahmen die Lipasewerte allmählich ab, welche Abnahme am 3.–6. Tage das Minimum erreichte, danach trat eine allmähliche Zunahme ein, bis am 10. Tage schliesslich die Norm wieder erreicht wurde Als Beispiel dient der Fall Nr. 59. Kurve I A.

Kurve I.

Einfluss der Hepatotoxininjektion auf die Serumlipase und den Harnstoff-Ammoniak-N Koeffizient im Harn.

Pfeil bedeutet Moment der Seruminjektion.

A: Lipasewert bei Hepatotoxininjektion.

B: (Kontrolle) Lipasewert bei Normalseruminjektion.

C: $\frac{\text{Harnstoff-N}}{\text{Ammoniak-N}}$ bei Hepatotoxininjektion.

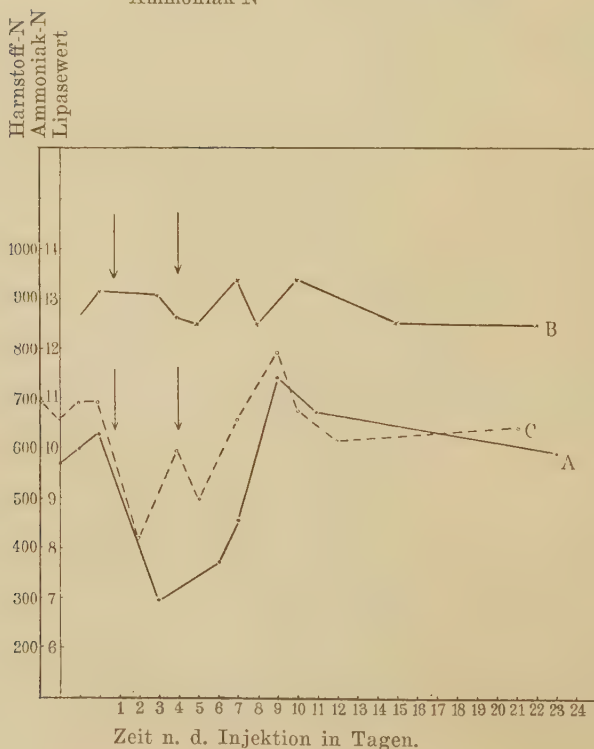


TABELLE II.

Einfluss der Hepatotoxininjektion auf die Serumlipase.

Nr. Körp. Gew.	44♂ 2150 g	45♀ 2580 g	53♀ 2180 g	52♂ 1910 g	57♂ 2100 g	58♂ 2145 g	59♂ 1920 g	60♂ 1665 g
Vor d. Injektion	15.10	16.61	17.10	18.50	16.40	15.10	9.70	8.14
	15.36	16.40	16.76	18.15	16.76	15.40	9.95	8.14
					16.40	15.37	10.32	8.14
Menge d. Hepat. cem.	5	5	5	5	5	5	5	5
N. d. Inj.								
1 Tage	14.67	15.71	16.40		3 cem (II. Injekt.)			
3 „	13.61	14.67	15.10	15.36	15.10	14.32	6.87	7.23
Menge d. Hepat. d. II. ten Injekt. in cem.	5	5	5		7	5		5
5 „	13.97	15.10	15.71	16.06	13.97	13.25		
6 „							7.72	5.40
7 „	14.32	15.70	15.91	16.20	13.97	14.32	9.02	9.02
9 „	14.67	15.70	16.06	17.31	16.09	15.67	11.41	9.45
10 „	15.10	16.06	16.76					
11 „							10.72	9.18
12 „	15.71		17.10					
13 „			16.40					
14 „	15.36	16.06	15.71					
19 „	15.36	16.76	16.71					
23 „							9.87	7.72
29 „	15.71		17.06					

3. Bei dem Kontrollversuche mit dem Serum von normalen Hunden (Tabelle III) waren die Schwankungen nur sehr gering.

V. HARNSTOFF UND AMMONIAKAUSSCHIEDUNG IM HARN NACH DER HEPATOTOXIN-INJEKTION.

Da nach den Resultaten der oben beschriebenen Versuche zwischen den Hepatotoxin-Versuchen und denen mit dem Normalserum deutliche Unterschiede bestehen, während es nicht klar ist,

TABELLE III.
Kontrollversuche.

Nr. Körp. Gew.	64 ♂ 1900 g	65 ♂ 2140 g	66 ♂ 2145 g
Vor d. Injektion	12.59 13.10	12.01 11.75	12.01
Menge d. injiz. Serum in ccm.	5	5	5
N. d. Injektion 3 Tage	13.03	11.70	12.45
Menge d. II. ten Injekt. in ccm.	5	5	5
4 „	12.61	11.60	12.15
5 „	12.45	12.01	12.45
7 „	13.30	11.75	12.45
8 „	12.45	12.01	12.01
10 „	13.30	11.60	12.01
15 „	12.45	11.60	11.92
22 „	12.45		12.15

Als Beispiel dient der Fall Nr. 64. Kurve I B.

ob diese Erscheinungen auf Leberschädigungen zurückzuführen sind, habe ich weiter den nachfolgenden Versuch unternommen.

A. Methodisches.

Gesunden Kaninchen wurde eine bestimmte Nahrung verabreicht und die Tiere an die Umgebung gewöhnt. Darauf wurde der Versuch begonnen. Die Nahrung bestand aus täglich 300 g Rückstand der Bohnenkäsebereitung und 40 g Gemüse.

Probeentnahme des Harns: Der Kaninchenstall wurde mit destilliertem Wasser ausgewaschen, der Trichterteil mit reiner Gaze abgebunden, und überhaupt so verfahren, dass die Futtermittel nicht mit dem Harn vermischt werden konnten. Um weiter den Harn vor Fäulnis und Ammoniakverlusten zu bewahren, habe ich in den Harnempfänger eine kleine Menge Toluol eingefüllt, weiter eine bestimmte Menge konzentrierter Schwefelsäure und Paraffin

dazugegeben. Dann wurde das katheterisierte Kaninchen in den Stall eingebracht und am nächsten Tage zur gleichen Zeit wie am vorhergehenden Tage und der entnommene Harn mit dem der Vorlage gemischt. Dieses Verfahren wurden immer streng aseptisch durchgeführt.

Bestimmungsmethoden: Harnstoffstickstoff (H-N) nach der Methode von Pincussen, Ammoniakstickstoff (AM-N) nach der Methode von Folin.

B. Die Resultate.

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle IV. angegeben.

Der Am-N nahm in allen Fällen am zweiten Tage deutlich zu, und da dazu der H-N abnimmt, so beträgt die Abnahme H-N/Am-N; danach tritt wieder eine Periode der allmählichen Erholung ein, und am 8.-9. Tage sind die Anfangswerte wiedergewonnen; zu dieser Zeit tritt dann eher eine Zunahme um H-N/Am-N und dann wieder Rückkehr zur Norm ein. Bei den Tieren Nr. 59 und Nr. 60 habe ich gleichzeitig auch die Lipasewerte bestimmt und gefunden, dass diese Werte der Formel H-N/Am-N parallel verliefen. Immerhin ist diese Ammoniak-Ausscheidungsanomalie von der Leberschädigung in gewissem Grade abhängig. Fujimoto (1919), Tagawa (1926) u. a. fanden Leberfunktionsstörungen den Kohlenhydratstoffwechsel und die immunobiologische Reaktion betreffend in der Zeitperiode zwischen der zweiten und fünften Woche nach der Intraperitonealinjektion des Hepatotoxins. Bei meinen Fällen wurde dagegen die Abnahme der Serumlipase nur während kurzer Zeit nach der Toxinapplikation beobachtet. Ob dieser Unterschied auf den Verschiedenheiten einzelner Leberfunktionen beruht, ist noch nicht klar.

VI. ZUSAMMENFASSUNG.

Nach des Verf. Ansicht sind die im weiteren Sinne bekanntesten Cytotoxine, dass Hämolsin und das Bakteriolsin, sicher organspezifisch und ihre Wirkung ist deutlich; der Ansicht aber, dass das Hepatotoxin nicht spezifisch und seine Wirkung gegenüber den betreffenden Organen nicht ganz klar sein soll, kann er sich

TABELLE IV.
Einfluss der Hepatotoxininjektion auf Harnstoff- und Ammoniakausscheidung im Harn.

Nr. Körp. Gew.	59 ♂ 1880 g				60 ♂ 1640 g				61 ♂ 1650 g			
	Harn- menge (cem)	Am-N (mg.)	H-N (g)	H-N Am-N	Harn- menge (cem)	Am-N (mg.)	H-N (g)	H-N Am-N	Harn- menge (cem)	Am-N (mg.)	H-N (g)	H-N Am-N
Vor d. Injek.	180 225 170 186	1.8 1.9 2.0 2.1	1.2646 1.2537 1.3641 1.4302	692 662 685 682	145 100 110	1.9 1.5 1.4	1.1287 0.9940 0.9226	595 663 659	130 135 167	1.7 2.0 2.2	1.0752 1.2456 1.4473	633 623 660
Iste Injek.	5 cem				5 cem				5 cem			
N. d. Injek.	135 140	2.8 1.5	1.1652 0.8945	417 596	87 140	3.9 2.6	0.8024 0.6736	230 254	161 175	3.0 1.8	1.1273 0.9635	376 535
IIte Injek.	5 cem				5 cem				5 cem			
5	107	2.0	0.9998	500	80	2.2	1.2836	583	125	1.7	1.0558	622
7	137	2.2	1.4402	655	120	2.4	1.3482	562	115	1.5	1.1513	767
9	140	1.4	1.1043	789	120	1.5	1.1688	780	134	1.8	1.1763	653
10	134	1.7	1.1487	674	120	1.5	1.1933	800	130	1.9	1.1766	620
12	124	1.7	1.0411	613	115	2.1	1.3020	620	117	1.9	1.2332	635
21	163	2.4	1.5247	637	122	1.5	0.9684	645	117	1.9	1.1892	625

Als Beispiel dient der Fall Nr. 59. Kurve I C.

nicht anschliessen. Jedoch müssen wir, wenn wir diese Frage näher betrachten, wohl zugeben, dass bei allen diesen Versuchen die Konstitution der Tiere, die Darstellungsmethode der Emulsion, die Impfmethode usw. für die Stärke der Giftwirkung von grosser Bedeutung sind. Unter gewissen Bedingungen wird ein starkes Gift die Organe beeinflussen, aber die Organfunktionen sind verschieden, es ist schwer zu entscheiden, welche Funktion ein Organ hat, oder es ist auch möglich, dass die Funktion des betr. Organs durch die eines anderen ersetzt wird, sodass wir die Funktionsveränderungen nicht erkennen können.

Nach den Ergebnissen des Verf., aus denen eine Parallelität zwischen der Formel H-N/Am-N und den Lipasewerten ersichtlich ist, scheint hervorzugehen, dass zwischen Leber und Serumlipase irgendwelcher Zusammenhang besteht. In der Tabelle V und der Kurve I sind die oben beschriebenen Resultate zusammengefasst.

TABELLE V.

Nr.	44	45	52	53	57	58	59	60	61	Mittelwert.
%										
Lipase	89.4	89.0	83.8	89.3	84.5	86.8	67.8	66.0		82.08
H-N							61.3	36.0	59.0	52.1
Am-N										

Wenn der Wert vor der Hepatotoxininjektion als 100 eingesetzt wird, dann ist der Wert nach der Injektion in % wie in der obigen Tabelle angegeben.

B. Einfluss der Röntgenbestrahlung der Leber auf die Serumlipase.

Untersuchungen über die Wirkung der Strahlen auf die Serumlipase sind ausserordentlich selten.

Sokolowski (1915) fand, dass durch die harten Strahlen von Mesothorium das lipolytische Ferment vermindert wird, dass dagegen Radiumemanation und weiche Thorium-Strahlen eine aktivierende Wirkung haben.

Pincussen (1922 u. 1928) fand, dass bei allgemeiner Bestrahlung von Kaninchen mit Röntgenstrahlen und ultravioletten Strahlen die Serumlipase abgeschwächt wird, während bei direkter Bestrahlung des Serums keine Veränderungen in der Azidität der Körperflüssigkeit zu beobachten sind. Azuma (1924) konnte bei allgemeiner Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen nicht zu demselben Ergebnis kommen.

Die Bestrahlung in meinen Versuchen wurde in der folgenden Weise durchgeführt:

Bestrahlungs-Apparat und -Bedingungen.

Apparat	Siemens-Halske A.G. (Stabiliport).
Spannung	160,000 V.
Sekundärer Strom	4 M.A.
Kürzeste Wellenlänge	0.09 A° E
Feldgrösse in cm	6 × 8
Fokusoberflächenabstand (F.H.A. cm)	23 oder 30.
Filterung	0.5 mm Cu, 2 mm Al. Platte.
Röhre	V-Typus Koolidge-Röhre von Siemens.

Bestrahlungszeit.

77 Min.	2 HED entspr. (F.H.A. 23 cm.)
19.25 Min. 1/2	„ „ („ „)
3 Min. 51 Sek. ... 1/10	„ „ („ „)
5 Min. 4.3/100	„ „ („ 30 cm.)

Mit Ausnahme der Kontrolltiere, die in der Lendengegend möglichst entfernt von der Leber vom Rücken her bestrahlt wurden, wurden alle Tiere in der Lebergegend von der Bauchseite her bestrahlt.

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle angegeben.

c) Das Befestigen der Kaninchen während 90 Minuten auf einer Platte blieb ohne jeden Einfluss auf die Serumlipase. (Tabelle VII. Nr. 69, Nr. 73.)

Blut oder Serum wurden direkt bestrahlt.

Als Kontrolle wurden Probiergläser in 5 mm starke Bleiröhren eingefügt und bestrahlt. Es wird von einigen Autoren angegeben, dass die Serumlipase längere Zeit haltbar bleibt, wenn man ihr

TABELLE VI.

Einfluss der Röntgenbestrahlung der Leber auf die Serumlipase.

Verlauf kurze Zeit nach der Bestrahlung.

Bestrahlungszeit 77 Minuten F.H.A. 23 cm.

Nr. Körp. Gew.	62 ♀ 2100 g	68 ♀
Vor d. Bestrahlung.	13.14	10.30
N. d. Bestrahlung.		
20 Min.	10.04	8.58
1 Std.	9.02	—
3 „	9.02	10.30
5 „	10.04	—
7 „	12.01	—
24 „	9.45	8.30
48 „	12.01	—
120 „	12.45	—

TABELLE VII.

Einfluss der Röntgenbestrahlung der Leber auf die Serumlipase.

Bestrahlungszeit 77 Minuten F.H.A. 23 cm.

Nr. Körp. Gew.	69 ♀ 2260 g	70 ♀ 2100 g	71 ♀ 1835 g	72 ♂ 1780 g	73 ♀ 2040 g	♀ 1860 g
Vor d. Bestrahlg.	12.89	6.86	12.89	11.59	9.88	11.17
	Befestigung					
	12.45	6.86	13.30	11.59		10.72
	12.45			11.59		
N. d. Bestrahlung.						
1 Std.	10.73	6.01	10.73	9.02	7.72	9.02
24 „	9.45	4.98	11.16	7.46	7.72	9.02
48 „	—	4.98	12.02	9.87	8.16	9.45
3 Tage.	12.88	—	—	10.73	—	—
6 „	12.01	5.65	10.73	10.13	—	—
7 „	—	—	—	—	9.28	11.17
11 „	—	—	—	—	9.28	—
12 „	—	—	—	—	—	10.30
14 „	—	—	9.45	10.30	—	—
15 „	—	5.58	—	—	9.60	—
					Befestigung	
15 „	—	—	—	—	9.45	—
16 „	—	—	—	—	9.70	—
17 „	10.72	—	—	—	—	—
30 „	—	7.30	—	—	—	—

Als Beispiel dient der Fall Nr. 72. Kurve II A.

Kurve II.

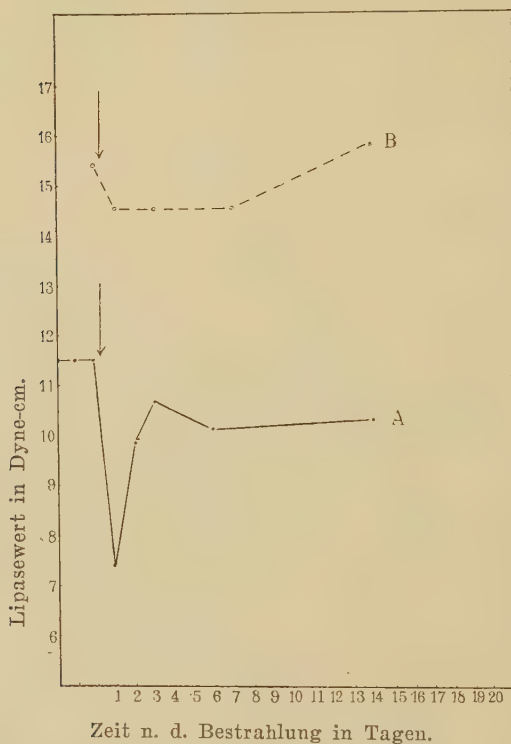
Einfluss der Röntgenbestrahlung der Leber auf die Serumlipase.

Pfeil bedeutet Moment der Röntgenbestrahlung.

(Bestrahlungszeit 77' F.H.A. 23 cm.)

A: Bestrahlung der Lebergegend.

B: (Kontrolle) Bestrahlung der Lendengegend.



den Sauerstoff entzieht. Da auch der Verf. diese Erfahrung gemacht hat, bestrahlte er das vom Sauerstoff befreite Blut und Serum. Bei der Bestrahlung wurde die Temperatur durch Eis konstant gehalten.

Die Bestrahlungsbedingungen waren die oben genannten.

Ausserdem:

Fokusabstand	23 cm
Bestrahlungszeit	47 Min. (I)
„	120 Min. (II) Tabelle XII.
„	77 Min. (III, IV)

TABELLE VIII.

Einfluss der Röntgenbestrahlung der Leber auf die Serumlipase.

Bestrahlungszeit 19'15" F.H.A. 23 cm.

Nr. Körp. Gew.	80 ♂ 1600 g	81 ♀ 1835 g	82 ♀ 2300 g
Vor d. Bestrahlung.	9.02 8.32	9.45 9.45	8.58 8.75
N. d. Bestrahlung.			
1 Std.	8.15	9.02	9.02
6 „	9.02	9.62	9.87
24 „	11.33	9.62	11.59
48 „	8.81	9.02	8.15
3 Tage.	9.02	10.42	8.58
5 „	7.18	11.45	9.87
7 „	10.72	11.15	9.35
9 „	9.44	10.72	10.72
14 „	9.02	9.45	9.87
15 „	—	9.02	—
18 „	8.58	—	9.18
22 „	8.58	9.18	8.15
37 „	8.58	9.60	9.02

Als Beispiel dient der Fall No. 82. Kurve III A.

TABELLE IX.

Einfluss der Röntgenbestrahlung der Leber auf die Serumlipase.

Bestrahlungszeit 3'51" F.H.A. 23 cm.

Nr. Körp. Gew.	98 ♂ 2950 g	99 ♀ 2590 g	100 ♀ 2080 g
Vor d. Bestrahlung.	16.75 16.75	6.78 —	15.46 15.46
N. d. Bestrahlung.			
12 Std.	17.62	8.58	17.19
24 „	18.90	8.58	18.03
3 Tage.	17.19	6.62	15.90
7 „	16.75	7.30	15.90

Als Beispiel dient der Fall Nr. 100. Kurve III B.

Kurve III.

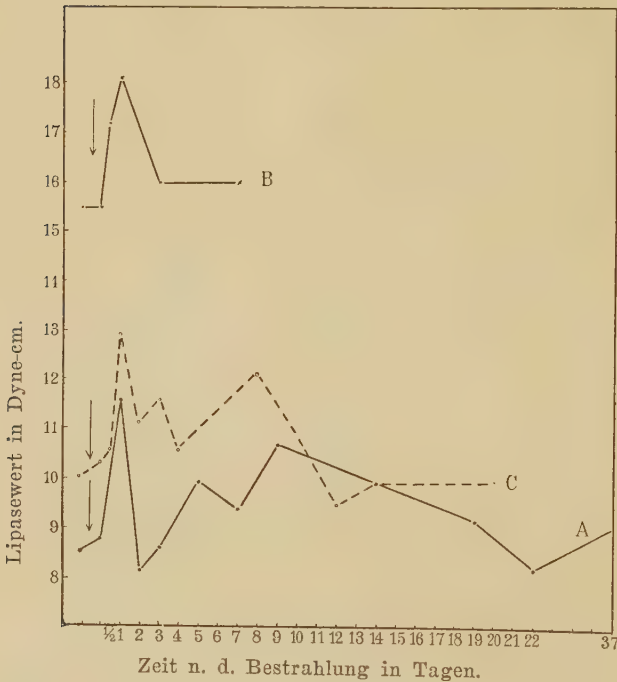
Einfluss der Röntgenbestrahlung der Leber auf die Serumlipase.

Pfeil bedeutet Moment der Röntgenbestrahlung.

A: Bestrahlungszeit 19'15" F.H.A. 23 cm.

B: Bestrahlungszeit 5' F.H.A. 30 cm.

C: Bestrahlungszeit 3'51" F.H.A. 23 cm.



Zu Tabelle XII:

I u. II

A: O₂ entzogen und bestrahlt.

B: Serum ohne Behandlung bestrahlt.

C: Bestrahlung in Bleiröhren. (Kontr.)

D: O₂ entzogen und ohne Bestrahlung im Eisschrank aufbewahrt. (Kontr.)

III u. IV

A: O₂ entzogen und bestrahlt.B: O₂ entzogen, nicht bestrahlt (Kontr.)

C: Blut unverändert bestrahlt.

D: Bestrahlung in Bleiröhren. (Kontr.)

E: Blut im Eisschrank ohne Bestrahlung aufbewahrt. (Kontr.).

TABELLE X.

Einfluss der Röntgenbestrahlung der Leber auf die Serumlipase.

Bestrahlungszeit 5 Minuten F.H.A. 30 cm.

Nr. Körp. Gew.	85 ♀ 1720 g	86 ♀ 2425 g	84 ♀ 1730 g	89 ♀ 2550 g	90 ♀ 9050 f
Vor d. Bestrahlung.	5.57 5.57 —	6.43 6.00 6.00	8.58 8.15 —	10.04 10.30 —	9.45 9.18 —
N. d. Bestrahlung.					
20 Min.	5.83	5.58	7.90	9.70	9.45
12 Std.	6.26	6.00	7.73	10.56	8.66
24 „	7.30	7.05	8.75	12.80	10.38
48 „	5.57	—	11.54	11.15	11.15
3 Tage.	—	6.43	8.75	11.59	10.73
4 „	—	—	7.97	10.56	10.30
5 „			8.58	—	—
6 „			—	—	8.58
7 „			7.72	—	—
8 „			—	12.85	10.72
10 „			9.18	10.30	9.45
12 „			—	9.45	9.45
13 „			7.72	—	—
14 „			—	9.87	9.45
19 „			—	9.87	9.02
21 „			9.45	—	—

Als Beispiel dient der Fall Nr. 89. Kurve III C.

TABELLE XI. (Kontrollversuche)

Einfluss der Röntgenbestrahlung der Lendengegend auf die Serumlipase.

Bestrahlungszeit 77 Minuten F.H.A. 23 cm.

Nr. Körp. Gew.	96 ♀ 2210 g	97 ♀ 2500 g	101 ♀ 2950 g
Vor d. Bestrahlung.	15.45	15.45	13.30
N. d. Bestrahlung.			
12 Std.	—	14.17	13.30
24 „	15.00	14.60	—
48 „	—	—	12.45
3 Tage.	14.20	14.60	12.46
5 „	—	—	13.30
7 „	—	14.60	—
8 „	15.00	—	—
14 „	15.80	15.89	13.72
24 „	—	—	12.87

Als Beispiel dient der Fall Nr. 97. Kurve II B.

TABELLE XII (Kontrollversuche)
Einfluss der direkten Bestrahlung des Blutes und Serums
auf die Serumlipase.

		Lipasewerte	Lipasebestimmung n. der Bestrahlung.
I) Serum.	A	16.90	30 Minuten.
	B	17.15	
	C	17.15	
	D	16.99	
II) Serum.	A	17.60	30 Minuten.
	B	17.15	
	C	17.60	
	D	17.60	
III) Blut.	A	16.30	60 Minuten.
	B	16.30	
	C	16.53	
	D	16.53	
	E	16.53	
IV) Blut.	A	16.30	20 Stunden. (im Eisschrank)
	B	16.30	
	C	16.49	
	D	16.49	
	E	16.49	

Wie die Versuchsergebnisse zeigen, ist die direkte Bestrahlung fast ohne Einfluss auf die Serumlipase.

Aus obigen Resultaten ist es klar, dass bei Bestrahlung mit einer relativ grossen Dosis die Lipasewerte abnehmen, aber im Gegensatz dazu bei Bestrahlung mit nur einer kleinen Dosis eher zunehmen.

Die Abweichungen in den Resultaten der obengenannten Forscher werden daher der Differenz der Bestrahlungsdosis zuzuschreiben sein. Ferner zeigte die Aktivität der Serumlipase mit der Zeit einen unregelmässigen wellenartigen Verlauf nach der Bestrahlung. Daher ist es sehr wichtig diese Tatsache in Betracht zu ziehen, ehe man von dem Effekt der Bestrahlung auf die Serum-

lipase spricht.

Dass die Veränderung der Serumlipase bei Bestrahlung mit Schädigungen der Leber zu tun hat, können wir aus den Ergebnissen der Kontrollversuche als richtig annehmen, es ist nämlich die direkte Bestrahlung des Blutes und Serums ohne jeden Einfluss, auch sind die Effekte der Bestrahlung vom Rücken her auf den Lendentheil nicht nennenswert.

Bezüglich der pathologischen Veränderungen bei der Bestrahlung mit harten Strahlen hat Kolodony (1925), der Kaninchen in der Epigastrialgegend mit einer grossen Dosis harter Strahlen bestrahlte, gefunden, dass die Leber hochgradige Hyperämie, Nekrose der Parenchymzellen, weiter pyknotische Kerne, Zerfall des Zellprotoplasmas und Degeneration der Kupfer'schen Zellen aufwies, während der Regenerationsmechanismus vom 5.-8. Tage an seine Tätigkeit begann.

Tsuzuki (1926), der Kaninchen im ganzen Körper mit verschiedenen Dosen bestrahlte, stellte die Veränderungen wie folgt fest:

Bestrahlung während	30 Min.	(Lokale Dosis 16%)Leichte Hyperämie.
„	45 „	(„ 24%)Fettgeh.-Zunahme der Kupferschen Zellen.
„	60 „	(„ 32%)Hyperämie-Zunahme. Auftreten von Fettgranula.
„	90 „	(„ 48%)Fortschreiten der Degen. der Leberzellen.
„	120 „	(„ 64%)Hochgradige Degeneration.

Diese Veränderungen gehen relativ rasch vor sich und lassen nach 36-48 Stunden nach. Nur eine kleine Zahl von Leberzellen bleibt degenerativ atrophiert.

Hisamoto (1928) hat durch Bestrahlung der Lebergegend Leberfunktionsstörungen erzielt. Nach ihm werden Störungen des Kohlehydratstoffwechsels und der Harnstoffbildungsfunktion, sowie Urobilinurie hervorgerufen.

Fassen wir diese Ergebnisse kurz zusammen, so ist zu sagen, dass bei Röntgenbestrahlung der Leber Funktionsanomalien vorkommen. Dass weiter die pathologischen Veränderungen relativ

rasch wieder abebben, stimmt auch mit meinen Beobachtungen überein.

C. Klinische Untersuchungen.

Bei meinen weiteren Untersuchungen kam es mir darauf an, festzustellen, welche Beziehungen zwischen Leber und Serumlipase bestehen, und ich habe deshalb nach den Tierversuchen auch in klinischen Fällen einige Bestimmungen gemacht, die dazu dienen sollten, die Zusammenhänge zu verdeutlichen. Dazu habe ich besonders bei Patienten mit hochgradiger Leberfunktionsstörung (Lebercirrhose) die Serumlipase bestimmt.

Die Bestimmungen wurden an dem Blut von in der Inneren Klinik aufgenommenen Kranken, welches morgens zur Hungerzeit entnommen wurde, gemacht.

Als Kontrolle wurde das Blut von gesunden Krankenschwestern zum Gebrauch angeboten. Die Resultate sind in Tabelle XIII zusammengestellt.

TABELLE XIII. (Kontrolle).

Nr.	Name	Alter	Lipasewerte
1	F. I.	20 J.	8.58
2	S. O.	20 J.	9.02
3	S. T.	18 J.	9.02
4	Y. K.	18 J.	9.02
5	W. S.	18 J.	9.02
6	T. S.	22 J.	9.02
7	K. K.	20 J.	9.45
8	Y. S.	20 J.	9.45
		Mittelwert	9.07

A. LIPASEWERTE VON VERSCHIEDENARTIGEN KRANKEN.

Sämtliche Beobachtungen sind in Tabelle XIV zusammengestellt.

TABELLE XIV.
Serumlipasewerte bei verschiedenen Krankheiten.

Name Alter	Körp. Gew. (kg)	Lipase- werte (d.c)	%	Klin. Diagnose.	Anmerkungen.
1 Hr. M., 36 J.	61.2	4.72	52	Lebercirrhose	Seit 4 Jahren Vorübergeh. Remission
2 Hr. G., 40 J.	49.4	3.86	43	Lebercirrhose (mit Ikterus)	Seit 5 J. Aszites. Exitus letalis.
3 Hr. O., 41 J.	57.3	3.01	33	Lebercirrhose	Seit 4 J. W. R. positiv.
4 Fr. Y., 49 J.	53.1	3.42	38	Lebercirrhose	Seit 1 J.
5 Hr. I., 57 J.	43.3	5.65	62	Leberkrebs	Seit Aug. 1930 Magenkrebs (prim.)
6 Hr. U., 54 J.	—	5.85	61	Leberkrebs	
7 Hr. Y., 24 J.	46.4	6.86	76	Katarrhar. Ikt.	Seit 10 Tagen. afebril. Leichtgrad. Ikterus.
8 Hr. M., 24 J.	—	8.16	90	Katarrhar. Ikt.	Seit 10 Tagen. afebril.
9 Hr. K., 70 J.	43.9	5.58	62	Magenkrebs (Herzschwäche)	Seit 20 J. Magen- beschwerden. Okkult. Blut stark posit.
10 Hr. C., 64 J.	62.1	6.45	71	Magenkrebs	
11 Hr. N., 54 J.	47.50	6.86	76	Magenkrebs	Seit 1 J.
12 Hr. Y., 57 J.	51.0	7.30	81	Magenkrebs?	Seit 6 J. Magen- beschwerden.
13 Fr. K., 62 J.	48.0	8.15	90	Magenkrebs?	Seit 4 Monaten Allgemeinzust. gut.
14 Hr. M., 50 J.	51.7	9.45	100	Magenkrebs?	Seit 5 J. Magen- beschwerden. W. R. stark positiv.
15 Hr. E., 45 J.	45.0	6.45	71	Pankreatit. chr. mit Glykosurie.	Seit 2 J.
16 Hr. T., 20 J.	49.7	7.30	81	Hämolyt. Ikterus Mitralinsuffiz.	Seit 6 J. vorübergeh. Ikt. W.R. stark positiv.
17 Hr. I., 18 J.	35.7	8.16	90	Milztumor	Seit 5 J. Milztumor
18 Hr. M., 20 J.	45.9	8.15	90	Nervöse Anorexie.	Seit 1 J.
19 Hr. T., 18 J.	—	8.58	95	Fried. Krankh.	

Wenn der normale Lipasewert (9.07 d/c) als 100 eingesetzt wird, dann sind die Lipasewerte bei verschiedenen Krankheiten in % die in Spalte 4 in der obigen Tabelle angegebenen.

Um einen Überblick zu haben, wurden die Resultate in der folgenden Tabelle XV kurz zusammengefasst.

TABELLE XV.

	Fälle.	Maximum.	Minimum.	Mittel.
a) Lebercirrhose	4	33%	52%	41.5%
b) Leberkrebs	2	61%	62%	61.5%
c) Icterus catarrhalis	2	76%	90%	83.0%
d) Magenkrebs(Sichere Diagnose)	3	62%	76%	69.7%
e) Chron. Pankreatitis	1			71.0%
f) Milztumor	1			90.0%
g) Sonstige Krankheiten				

Es ist sehr bemerkenswert, dass bei Lebercirrhose die Serumlipasewerte in bedeutenden Masse herabgesetzt sind. Auch bei Leberkrebs ist das ziemlich auffallend.

Bei Icterus catarrhalis, bei dem immer irgendeine Leberschädigung vorhanden ist, können wir nur eine ganz kleine Verminderung konstatieren. Hier ist natürlich zu beachten, dass durch Galle die Serumlipase in irgendeiner Weise beeinflusst, aber nicht immer aktiviert wird.

Ferner war bei den oben angegebenen zwei Fällen von Icterus catarrhalis der Krankheitsprozess bei der Untersuchung grösstenteils abgeklungen, und daher die Tätigkeit der Leber nicht so stark beeinträchtigt.

B. TUBERKULOSE UND LIPASE.

Die Resistenz der verschiedenen Tierarten gegenüber der Tuberkulose ist verschieden; am empfindlichsten sind bekanntlich die Meerschweinchen. Nach Calmette beträgt der Lipasewert bei Meerschweinchen nur $\frac{1}{4}$ von dem des Menschen und von Hunden

Auch bei Menschentuberkulose wurde ein inniger Zusammenhang zwischen Fettumsatz und Krankheitsprozess von vielen Autoren festgestellt.

Ausserdem finden wir oft im Verlaufe der Lungentuberkulose teilweise Funktionsstörungen der Leber. Aus verschiedenen Versuchen mit dem Urobilin, dem Gallenfarbstoff, der Gallensäure usw. haben verschiedene Forscher auf einen Zusammenhang mit den Leberfunktionsstörungen hingewiesen. Auch in der Literatur über den Serumlipasegehalt bei an Lungentbc. Erkrankten finden wir die Angabe, dass bei der gutartigen cirrhotischen Form der Lipasewert hoch ist, dagagen bei der bösartigen progressiven Form der Lipasewert herabgesetzt ist. (Bauer (1912) u. a.). Kollert und Frisch (1920) haben sogar die Ansicht geäussert, dass man daraus die Schwere des Erkrankungsgrades erkennen und die Prognose stellen könne. Beumer (1921) aber hat sich gegen diese Ansicht ausgesprochen.

Roger (1923) u. a. haben eine Beziehung zur Lipodiärese hergestellt und Bergel (1921) meinte, dass die von den Lymphozyten stammende Lipase die Wachshülle der Tuberkelbazillen auflöse. Aschoff u. a. lehnten diese Auffassung ab.

Die Untersuchungsergebnisse des Verf., wie in Tabelle XVI angegeben, stimmen anscheinend mit denen von Kollert und Frisch gut überein.

D. Diskussion.

Unsere jetzigen Kenntnisse über den Ursprung der verschiedenen Blutbestandteile sind sehr mangelhaft.

Wir können betreffs der Serumlipase keinen sicheren Beweis dafür führen, in welchem Organ sie produziert und in die Blutbahn abgesondert wird.

Wenn aber infolge der Reizung oder Schädigung irgendeines Organs der Fermentgehalt im Blut Zu- oder Abnahme zeigt, dann können wir als sicher annehmen, dass das Organ zu der Fermentproduktion in enger Beziehung steht.

Bestehen an dem Bildungsort leichte pathologische Veränderungen, so wird manchmal, wie wir aus der Literatur wissen,

TABELLE XVI.
Serumlipasewerte bei Tuberkulose.

Name Alter	Körp. Gew. (kg)	Lipase- werte (d.e)	%	Klin. Diagnose.	Anmerkungen.
1 Fr. T., 31 J.	45.3	10.75	119	R. Spitz. katarrh.	Temperatur normal. Seit 3 Monaten.
2 Mädch. S., 15 J.	42.8	10.30	113	Hiloap. affek. Pleur. adh. sin.	T. norm. Seit 8 Monaten.
3 Hr. K., 25 J.	47.2	9.87	109	Hiloap. affek.	T. norm. Seit 3 Monaten.
4 Hr. N., 22 J.	59.0	9.87	109	Hiloap. affek.	T. norm. Seit 10 Monaten.
5 Hr. O., 22 J.	56.4	9.45	104	Spitz. infiltr.	T. norm. Seit 8 Monaten.
6 Hr. N., 41 J.	53.6	9.45	104	Hilusdr. Tbc.	T. norm. Seit 8 Monaten.
7 Hr. O., 24 J.	53.4	9.45	104	Hilusdr. Tbc.	T. um 37.2° C. Seit 4 Monaten.
8 Fr. T., 22 J.	46.0	9.45	104	Hilusdr. Tbc.	T. norm. Seit 2 Monaten.
9 Fr. M., 25 J.	41.0	9.45	104	Phth. pulm. dup.	subfebril. Seit 2 Monaten.
10 Fr. S., 34 J.	39.0	9.45	104	Phth. pulm.	T. norm. Seit 4 Monaten.
11 Hr. S., 32 J.	49.9	9.00	99	Hiloap. affek.	T. norm. Seit 1 Jahr.
12 Fr. Y., 24 J.	37.4	9.00	99	Darmtuber- kulose?	T. norm. Seit 1 Jahr.
13 Hr. I., 27 J.	48.0	9.01	99	Phth. pulm. sin.	T. norm. Seit 7 Monaten.
14 Hr. S., 21 J.	48.3	8.95	99	Spitz. infiltr.	T. norm. Seit 8 Monaten.
15 Hr. T., 18 J.	60.0	8.58	95	Phth. pulm. sin.	T. norm. Seit 10 Monaten.
16 Fr. M., 26 J.	42.5	8.58	95	Phth. pulm.	T. vorüberg. subfebril. Seit 4 Monaten.
17 Hr. M., 23 J.	30.7	8.58	95	R. Spitz. infiltr. Amöbenruhr. Gastroektasie.	
18 Hr. M., 24 J.	45.8	8.15	90	Phth. pulm. dup.	T. Anfangs hohes Fieber Entfieberung. Seit 2 Jahren.
19 Hr. O., 22 J.	46.4	8.15	90	Phth. pulm. dup.	37.3° C. Seit 7 Monaten.

TABELLE XVI. (Fortsetzung)

Name Alter	Körp. Gew. (kg)	Lipase- werte (d.e)	%	Klin. Diagnose.	Anmerkungen.
20 Hr. M.,	51.5	7.74	85	Mesent. lymphdr.- Tuberculose. Phth. pulm.	T. um 37.5°C. Seit 7 Monaten.
21 Hr. U., 22 J.	48.7	7.73	85	Phth. pulm. sin.	T. norm. Seit 3 Jahren.
22 Frä. A., 21 J.	48.6	7.73	85	Phth. pulm. dex.	T. subfebril. Seit 6 Monaten.
23 Hr. M.,	47.0	7.28	80	Phth. pulm. dex. alte Pleuritiden.	T. subfebril. Seit 2 Jahren.
24 Frä. K., 42 J.	33.5	6.01	66	Phth. pulm. Bronch. chronica.	T. um 38.0°C. Seit 20 Jahren.
25 Hr. T., 24 J.	51.0	6.86	76	Phth. pulm. dup. alte Pleuritiden.	T. um 37.0°C. Seit 2 Jahren.
26 Frä. H., 22 J.	50.1	6.00	66	Phth. pulm. Darmtuberkulose.	T. um 39.5°C. Seit 1.5 Jahren.
27 Frä. N., 35 J.	41.0	5.15	57	Phth. pulm. dup.	Hohes Fieber. Seit 2.5 Jahren. Exitus letalis.

eine vorübergehende Zunahme in der Ausscheidung einsetzen, wenn aber das von dem betr. Organ abgesonderte Enzym fehlt oder das betr. Organ eine tiefe Funktionserniedrigung zeigt, dann wird auch die Enzymproduktion herabgesetzt, und da ein Ersatz nicht möglich ist, wird alsbald der Gehalt des Blutes an dem Enzym abnehmen.

Die Vermehrung oder Verminderung der Serumlipase in des Verf. Versuchen mit der Cytotoxin-Injektion oder der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen ist in diesem Sinne zu erklären. Es werden wohl darüber hinaus noch unbekannte Ursachen bestehen, sicher aber geht aus meinen Versuchen ganz allgemein hervor, dass in den Fällen, in denen eine Leberfunktionsschädigung angenommen werden muss, die Lipasewerte abnehmen. Unter verschiedenen Krankheiten nahm der Lipasewert bei Lebercirrhose am deutlichsten ab. Bei schwerer Phthisis nahm der Wert ab, während er bei gutartiger im Anfangsstadium eher zunahm. Sollte hier nicht ein Reizvorgang von seiten der Tuberkelbazillen vorliegen? Nach allem scheint also doch zwischen der Lipase und der Leber irgend-

welcher Zusammenhang, ebenso auch ein gewisses Verhältnis zwischen Lungentuberkulose und Lipase zu bestehen.

Ganz allgemein gesprochen, lässt sich wohl sagen, dass die Leber die Bildungsstätte der Lipase ist. Wenn aber die Lipase aus der Lunge stammen sollte, dann liesse sich sagen, dass die Erniedrigung der Lipasewerte bei schweren Phthisikern eine Folge von Lungenfunktionsstörungen ist. Sichere Tatsachen stehen uns aber jedenfalls noch nicht zur Verfügung, und es bleibt uns nichts übrig, als weitere Untersuchungen abzuwarten.

ALLGEMEINE ZUSAMMENFASSUNG.

A. Hepatotoxin.

1. Wenn man Kaninchen Hunde-Antikaninchenleberserum in die Ohrvene injiziert, nehmen die Serumlipasewerte ab, erreichen am 3.-6. Tage das Minimum, steigen dann bis zum 10. Tage wieder an und kehren danach fast gänzlich zur Norm zurück.

2. In gleichsinniger Weise nimmt in dem ausgeschiedenen Harn die Harnstoffmenge ab und die Ammoniakmenge zu, sodass eine Abnahme nach der Formel $H-N/Am-N$ vor sich geht. Zu dieser Zeit laufen die Lipasewerte parallel der durch die Formel erhaltenen Abnahme.

3. Bei den Kontrolltieren (Normalserum) zeigen die Lipasewerte keinerlei Veränderungen.

B. Röntgenbestrahlung.

1. Wenn man die Leber von Kaninchen 77 Min. lang mit harten Strahlen bestrahlt, erreichen die Lipasewerte nach 24 Stunden das Minimum, danach besteht Neigung zu relativ rascher Zunahme, aber die vollständige Rückkehr zur Norm tritt erst 15 Tage später ein.

2. Bei der Bestrahlung der Lendengegend mit der gleichen Dosis als Kontrolle nehmen die Lipasewerte nur leicht ab. Der Unterschied gegenüber der Bestrahlung der Lebergegend ist auffallend.

3. Die direkte Bestrahlung des Blutes und des Serums mit

grossen Dosen ist auf die Lipasewerte fast ohne jeden Einfluss.

4. Die Befestigung der Kaninchen auf einem Brette während längerer Zeit hat auf die Lipasewerte keinen Einfluss.

5. Bei Bestrahlung der Lebergegend mit kleinen Dosen (19 Min. 15 Sek., 5 Min. und 3 Min. 51 Sek.) tritt meist nach 24 Stunden eine vorübergehende Zunahme auf, welche verhältnismässig rasch zur Norm zurückkehrt und dann nach einer bestimmten Zeit sich wieder einstellt.

6. Bezüglich der Zunahme der Lipasewerte bei verschiedenen Krankheiten ist die Reihenfolge die folgende: Leberkrebs, Magenkrebs, schwere Phthisis und sonstige Krankheiten.

Bei Patienten mit Lungentuberkulose leichter Form nehmen im Anfangsstadium die Lipasewerte im Gegenteil zu.

Am Schlusse dieser Arbeit ist es mir aufrichtiges Bedürfnis meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Prof. Dr. Kodama und Herrn Prof. Dr. R. Kaneko für Anregung und Leitung bei Ausführung dieser Untersuchungen, sowie für freundliche Durchsicht meines Manuskriptes meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Aschoff, L. und Kamia, H. (1922): Deut. Med. Ws., **48**, 724.
 Azuma, T. (1924): Journ. of Bioch., **4**, 239.
 Bergel, S. (1921): Die Lymphozytose, Berlin.
 Brockmyer, J. (1924): Klin. Ws., **3**, 1526.
 Bayer, G. (1919): Zeits. f. Biolog., **69**, 365.
 Bauer, J. (1912): Wien Klin. Ws., **25**, 1376.
 Beumer, H. (1921): Berl. Klin. Ws., **58**, 855.
 Du Nöuy, L. (1926): Surface Equilib. of biolog. a. organic colloid.
 Formann, J. (1911): Bioch. Zeits., **37**, 78.
 Fujimoto, B. (1919): Nissbinigaku, **9**, 1343.
 Hanriot, M. und Authus, M.: Zit n. Oppenheimer in „Die Ferm. u. ihre Wirkung“.
 Hess, V. (1911): Journ. of Biol. Chem., **10**, 381.
 Hiruma, K. (1924): Bioch. Zeits., **139**, 336.
 Hisamoto, J. (1928): Nihon Rentogengaku Zasshi, **6**, 121.
 Iris, E. (1923): The Journ. of Gastroenterol. Kyoto, **1**, 9.
 Kolodony, A. (1925): Am. Journ. of Path., **1**, 285.
 Kollert, V. und Frisch, A. (1920): Beitr. z. Klin. d. Tuberkul., **43**, 305.

- Oyama, T. (1921): Tokyo Igakkai Zasshi, **38**, 941.
- Pincussen, L. und Anagnostu, L. J. (1922): Bioch. Zeits., **128**, 268.
- Pincussen, L. und Hayashi, S. (1928): Bioch. Zeits., **195**, 79.
- Rona, P. und Michaelis, L. (1911): Bioch. Zeits., **31**, 345.
- Rona, P. und Bien, Z. (1914): Bioch. Zeits., **59**, 100.
- Rona, P. und Reinicke, D. (1921): Bioch., Zeits., **118**, 213.
- Rona, P. und Pavlovic, R. (1922/23): Bioch. Z., **130**, 225; **134**, 108.
- Rona, P. und Takata, M. (1923): Bioch. Zeits., **134**, 118.
- Rona, P. und Petow, H. (1924): Bioch. Zeits., **146**, 144.
- Roger, H. (1923): Journ. de Phys. Path., **21**, 461.
- Simon, Fr. (1924): Klin. Ws., **3**, 674.
- Sokolowski, I. (1925): Strahlentherapie, **6**, 419.
- Tagawa, J. (1926): The Journ. of Gastroen. Kyoto, **1**, 347.
- Tsuzuki, M. (1926): Nihon Gekagakkai Zasshi, **27**, 253.
- Willstätter, R. und Memmen, F. (1924): Zeits. Physiol. Chem., **133**, 216.
- Willstätter, R. und Memmen, F. (1924): Zeits. Physiol. Chem., **138**, 216.

ON THE CYSTIN CONTENTS OF HUMAN HAIR. II.

BY

TETSUTARO TADOKORO AND HANAKO UGAMI.

(From the Biochemical Laboratory, Faculty of Science, Hokkaido Imperial University, Sapporo.)

(Received for publication, November 28, 1931)

In their first report Tadokoro and Ugami (1930) on the same investigation of human hair, the following facts were stated as conclusions: 1) The cystin content varies with the different parts of hair and that of the terminal part is always less than that of the other parts. 2) The cystin content of young men's hair, that showed powerful growth, is less than that of old men. 3) The ratio of cystin to the total nitrogen is always constant in different ages while the cystin content varies with the ages of people. 4) The melanin content of black hair is far greater than that of white, and the cystin content of the former is rich, while the nitrogen content is poor. These results of our first report showed us that it is necessary to pay particular attention to the selection of the samples. Thus for the investigation of the difference of the cystin content between human races, the samples must be taken from the same part of hairs which are collected from the same part of the body of persons of the same age. Therefore all results which have hitherto been reported by many previous authors, as reviewed in our first report, are not reliable. So the samples of hairs used in this investigation were collected as total hairs from corpses by the courteous help of Prof. Mildred Trotter of Washington University U.S.A. Here we express our hearty thanks for his kindness in helping to secure these collections.

Our new object of investigation was to determine the differences of cystin, sulphur and nitrogen content between the head and the pubic hairs of the same person.

PREPARATION OF HAIRS AND METHOD OF DETERMINATION OF
CYSTIN, SULPHUR AND NITROGEN CONTENTS.

Preparation of the sample hairs was carried out in the following way: the collected hair was washed in water, freed from dust and washed many times with alcohol; then the dried materials were extracted with ether for 4 days in Soxhlet's apparatus and the fat-freed residue was dried and reserved for analysis.

For the determination of cystin in hair, Okuda's (1925) new method was used with the following modification: 0.2 g of sample was hydrolysed with 10 cc. of 20% HCl connecting the reflux condensor for 15 hours on a sand bath. It was diluted with water, decolorized with animal charcoal and placed in a measuring flask of 50 cc. For the titration with iodate solution (m/100), we conducted the reduction by Zn-dust, until the maximum value of cystin was obtained.

For the determination of sulphur, Denis-Benedict's method

TABLE I.
Sulphur content.

Races	Person	Ages	Hairs, collected parts of body		
			Head %	Public %	Ratio $\frac{\text{Pubic}}{\text{Head}}$
White	Men	40	4.372	4.517	103
"	"	49	4.791	4.694	99
"	"	63	4.814	4.666	97
"	"	65	4.976	4.704	95
"	"	68	4.869	4.439	91
"	"	71	5.147	4.699	91
"	Women	51	4.547	4.216	93
"	"	60	4.737	4.670	98
Negro	Men	28	4.024	3.748	93
"	"	45	4.564	4.305	94
"	"	57	4.608	4.358	95
"	"	60	4.426	4.300	97
"	"	79	4.663	4.508	97
"	Women	23	4.882	4.512	92
"	"	43	4.512	4.442	98
"	"	80	4.370	3.992	91
Colored	Men	25	4.466	4.268	96
"	Women	33	4.643	4.479	96

TABLE II.
Nitrogen and cystin content

Races	Person	Ages	Head hairs			Pubic hairs		
			Nitrogen %	Cystin %	Cyst./N	Nitrogen %	Cystin %	Cyst./N
White	Men	49	15.37	14.21	0.924	15.51	13.86	0.894
	"	63	15.18	14.70	0.968	15.50	14.20	0.916
	"	65	14.94	14.56	0.975	14.82	14.15	0.955
	"	68	14.35	14.56	1.015	14.24	13.66	0.959
	"	71	14.78	15.92	1.077	14.44	13.00	0.900
	Women	51	15.05	15.51	1.031	15.20	15.09	0.993
	"	80	15.60	15.83	1.015	15.50	15.10	0.974
	Men	28	15.19	13.25	0.872	15.00	11.50	0.766
	"	45	14.93	14.00	0.938	14.95	13.40	0.896
	"	51	14.59	15.22	1.031	14.30	14.76	0.032
Negro	"	60	14.50	13.63	0.940	14.73	12.63	0.857
	"	79	15.15	13.99	0.925	14.84	13.00	0.876
	Women	23	15.20	14.27	0.939	15.15	13.50	0.891
	"	43	14.98	14.98	1.000	14.49	13.82	0.96
	"	70	14.60	13.95	0.955	14.72	12.69	0.862
	Men	25	15.46	15.37	0.994	15.06	14.55	0.966
	Women	33	14.60	13.44	0.920	14.52	13.37	0.92
	"							
	"							
	"							
Colored	Men							
	Women							

was used; for the nitrogen determination, the ordinary method, so their description is omitted here.

RESULTS OF THE EXPERIMENT

The samples which were prepared as mentioned above were analysed for their cystin, sulphur and nitrogen contents. The results are tabulated in dry matter percentage.

From Table I, can be seen that the sulphur content of head-hairs is always greater than that of public hairs.

From Table II, can be seen that the ratio of cystin and nitrogen of head hairs is always greater than that of public hairs. And it also can be seen that the sulphur and cystin contents of white races are higher than that of negro and coloured races.

RESUMÉ.

The comparison of sulphur content and of cystin/nitrogen ratio in hairs from head and public parts shows that there are two distinct differences between the two parts of the body. The Sulphur content of head hairs is always greater than that of public hairs.

REFERENCES.

- Okuda (1925): Jour. Dept. Agr. Kyushu Imp. Univ., 1, No. 4.
Tadokoro and Ugami (1930): Jour. Biochem., 12, 187.

ON THE HYDROLYSIS OF NUCLEIC ACID, NUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDES.

By

YEITARO KOBAYASHI.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical School,
Niigata. Director: Prof. N. Ariyama.)

(Received for publication, November 8, 1931)

Among the numerous investigations made with the object of finding a clue to the knowledge of hydrolysis of nucleic acid, few have been more suggestive than those performed by Jones and his co-workers. On hydrolyzing yeast nucleic acid with 5% sulphuric acid at 100°, he (1916) found that exactly one half of its phosphorus was split off rapidly and completely in less than two hours, while half was liberated quite slowly at a regular rate. The source of the phosphorus which came off easily was found to be purine nucleotides and the other to be pyrimidine nucleotides. He and his associates collected experimental data in support of this view by hydrolyzing purine nucleotides (Jones and Read, 1917 iv; Jones and Kennedy, 1919 i & ii; Jones, 1920), purine-pyrimidine dinucleotides (Jones and Germann, 1916; Jones and Read, 1917 i & ii) and pyrimidine dinucleotide (Jones and Read, 1917 iii). Jones' view as it stands does not, however, account for the individual difference of four nucleotides in their resistance to hydrolysis but only the rough distinction between purine and pyrimidine fractions. In this connection Yamagawa (1920) gave a more detailed account. He applied monomolecular law to the process of hydrolysis of each nucleotide with 0.1*N* sulphuric acid at 100°; the constant of hydrolysis ($K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$) calculated from the amount of phosphorus liberated was 130×10^{-2} for yeast nucleic acid, $166 \sim 177 \times 10^{-2}$ for purine nucleotides and 486×10^{-3} for uracil nucleotide. Thus the old idea of Levene and others that the pyrimidine-ribose-nucleotides

possess higher resistance towards hydrolysis than the purine nucleotides, was fully substantiated. Recently Hoffman (1927) studied the pentose partition in yeast nucleic acid by the application of Younburg and Pucher's method (1924) of determining pentose somewhat modified. The method depends upon the conversion of pentose into furfural by steam-distillation in the medium of hydrochloric acid, and the colorimetric determination of the furfural thus formed by aniline-acetic acid reagent. He found that a 3 hours' distillation of purine nucleotides with 20% HCl caused 100% production of furfural, while cytosine and uracil nucleotides gave only 4.5 and 13.7% respectively of the theoretical amount of furfural. This finding indicates that there is a subordinate difference in the resistance of the pyrimidine nucleotides to hydrolytic agents, cytosine nucleotide being more resistant than uracil nucleotide. Such a sharp dividing line could not, however, be drawn between purine nucleotides. He also noticed that adenosine and guanosine were hydrolyzed somewhat more rapidly than the corresponding nucleotides. Though the Hoffman method has proved of great value for the pentose determination, it is yet impossible to follow all the reactions of hydrolysis of nucleic acid with quantitative precision by this method. He assumed that the speed with which d-ribose is converted into furfural would be about the same as that of xylose; 10 mg. of xylose gave quantitative yield of furfural after 3 hours' distillation from 50 cc. of 20% HCl, while arabinose gave 50%. Then the quantitative formation of furfural from pentose which has been liberated by partial hydrolysis of nucleic acid, may cause simultaneously a further hydrolysis of the remaining nucleic acid and the subsequent conversion of pentose thus formed into furfural. Yet the method seems to offer a fresh means of studying the rate of hydrolysis of nucleic acid and nucleotides; especially of nucleosides, the purine or pyrimidine bases of which are determined only with trouble or great difficulty. And much more so when the liberation of phosphoric acid does not necessarily mean the complete hydrolysis of nucleic acid into its constituents but there is the possibility of the intermediary formation of nucleosides. On the other hand

the liberation of furfural results directly from the complete disintegration of nucleic acid.

All the available evidence shows that the resistance to the hydrolytic agents varies not only between purine and pyrimidine nucleotides but also in individual nucleotides. An indication has furthermore been given that such difference may also exist among nucleosides. The present experiments were devised with the object of getting further information about the rate of hydrolysis of individual nucleotides and nucleosides.

EXPERIMENTAL.

I. Material Used and Measuring Methods.

The methods of preparation of the material used and its purity are grouped in condensed tabular form (Table I). The samples may well be considered to be pure enough for the purpose of the present experiments. The purity was calculated, when necessary, on the basis of their nitrogen content. Guanine nucleotide was used in the form of the tertiary sodium salt and the other nucleotides in the forms of brucine salts. The possibility that the presence of brucine in the molecules of the material to be tested might exert a retarding effect on their hydrolysis was not excluded.

The hydrolysis of nucleotides was surveyed by measuring the amount of phosphorus and ribose liberated, and that of nucleosides by estimating ribose. Free phosphorus was determined colorimetrically by Kuttner's method (1927, 1930) after it had been precipitated as magnesium ammonium phosphate from the ammoniacal solution and then dissolved in the smallest possible amount of diluted sulphuric acid.

Pentose was determined by the slightly modified Hoffman method. Because of the fact that furfural is set free from pentose only at a slow rate, this method, it should be understood, does not give results with anything approaching quantitative accuracy. It offers only a clue to the comparison of the relative rate of hydrolysis of nucleotides or nucleosides.

TABLE I. Material Used.

Material	N in 100 mg.		P in 100 mg.		N : P		Method of preparation
	Theor. mg.	Found mg.	Theor. mg.	Found mg.	Theor. mg.	Found mg.	
Guanine nucleotide (tertiary Na salt)	16.32	15.78	7.21	7.13	2.25	2.21	H. Steudel and E. Peiser (1922)
Guanosine	24.74	22.47	—	—	—	—	P. A. Levene and W. A. Jacobs (1910)
Adenine nucleotide (brucine salt)	9.99	9.16	2.46	2.12	4.05	4.32	W. Jones and R. P. Kennedy (1919)
Adenosine	23.22	24.15	—	—	—	—	P. A. Levene and W. A. Jacobs (1910)
Uracil nucleotide (brucine salt)	6.78	6.65	2.59	2.36	2.71	2.82	P. A. Levene (1918)
Uridine	11.48	10.70	—	—	—	—	P. A. Levene and W. A. Jacobs (1912)
Cytosine nucleotide (brucine salt)	7.93	7.39	2.51	2.25	3.17	3.28	P. A. Levene (1918)
Cytidine	17.3	16.0	—	—	—	—	P. A. Levene and W. A. Jacobs (1910; 1912)

II. *Hydrolysis of Nucleic Acid.*

When yeast nucleic acid is hydrolyzed with relatively mild agents (5% H_2SO_4 , 100°C), the curve of the liberation of phosphorus shows a rapid initial rise, sharp turn and termination in a straight line. Jones has clearly shown that this sharp turn at the 50% point is due to the rapid and complete liberation of phosphorus from purine nucleotides and that the straight line following it is caused by the slow release of phosphorus from pyrimidine fractions. It is, however, open to question whether the straight line for pyrimidine-phosphorus will keep the same course till 100% liberation of phosphorus is achieved. The fact that cytosine nucleotide is much more resistant to hydrolytic agents than uracil nucleotide, makes it plausible to expect another turn of the phosphorus-curve of nucleic acid at a point between 50 and 100%.

By increasing the concentration of acid and temperature, the writer caused more deep-seated hydrolysis of nucleic acid and followed the rate of the liberation of phosphorus. 1.00 gm. of yeast nucleic acid was hydrolyzed with 100 cc. of 5% sulphuric acid at 100° , 110° and 120° ; with 12% hydrochloric acid at 130° ; and with 15% hydrochloric acid at 140° respectively. The curves are typified by Fig. 1.

The curves of hydrolyses with mild agents (5% H_2SO_4 , 100° or 110°) terminated in a straight line after a rapid initial rise and the subsequent sharp turn at the point of 50% hydrolysis. When the conditions were so chosen that hydrolysis took place with moderate speed (5% H_2SO_4 , 120°), the curve showed another turn at the point of 78.6% hydrolysis. After this turn it ended again in a straight line. With strong agents (12% HCl , 130° ; 15% HCl , 140°) the curves showed turns in the neighbourhood of the 80% point. It is also revealed in Fig. 1 that the curves bent at higher points of hydrolysis when stronger agents were applied.

The same phenomena were observed when yeast nucleic acid was hydrolyzed with alkali (Fig. 2). Slowing down of the speed

Fig. 1. Acid Hydrolysis of Nucleic Acid.
(Phosphorus-determination)

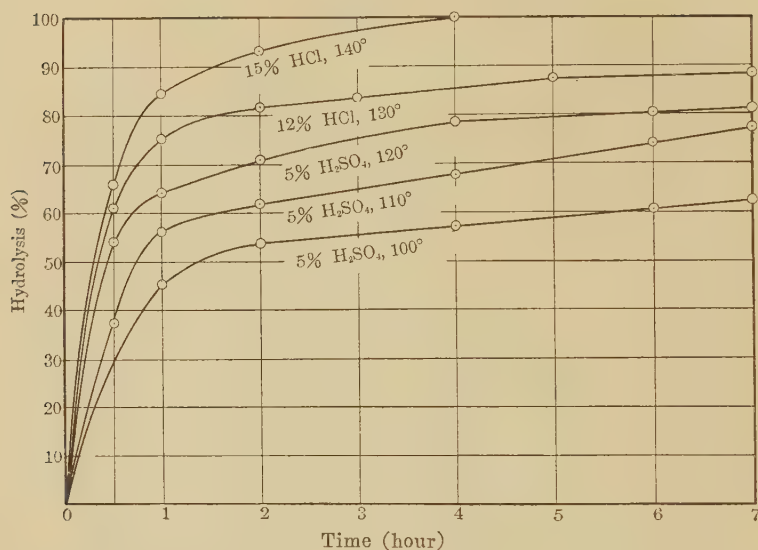
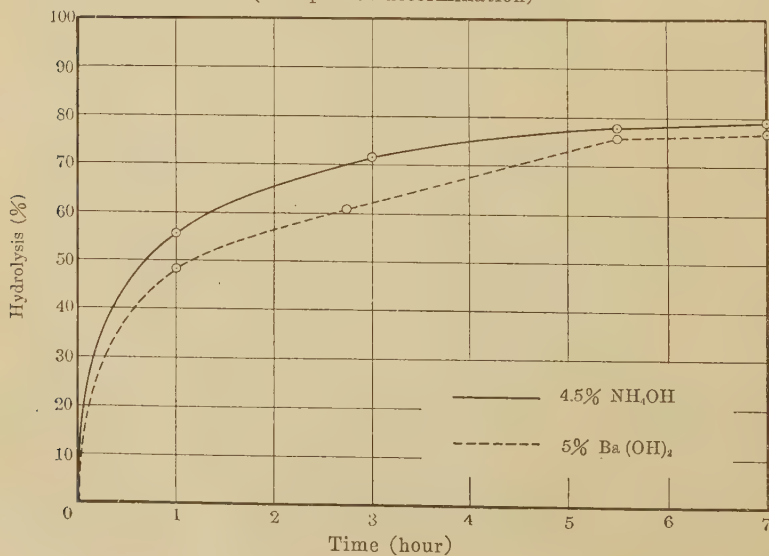


Fig. 2. Hydrolysis of Nucleic Acid with Alkali.
(Phosphorus-determination)



of hydrolysis took place twice; once at the 50%, and once near the 80% point.

All these findings indicate that the rate of hydrolysis differs not only between purine and pyrimidine nucleotides but between two pyrimidine fractions. The solution of this problem must await an elucidation of the manner in which the individual nucleotide undergoes hydrolysis.

III. Hydrolysis of Nucleotides.

0.66 gm. of guanine nucleotide (Na-salt) and 1.9 gm. of other nucleotides (brucine salts) were dissolved in 50 cc. of 12% hydrochloric acid and heated on the direct flame. One gm. of nucleic acid corresponds to 0.33 gm. of guanine nucleotide and 0.95 gm. of other nucleotides. As nucleic acid consists of four nucleotides, the quantitative proportion of each nucleotide to the hydrolyzing acid is the same as in the case of hydrolysis of 1.00 gm. of nucleic acid with 100 cc. of acid when these quantities of nucleotides are treated with 25 cc. of acid, or twice the quantities are hydrolyzed with 50 cc. of acid. The rates of hydrolyses were compared with one another by determining periodically the amount of phosphorus set free. The results are shown in Table II.

From the difference of resistance towards hydrolysis the nucleotides may be, as have been repeatedly observed, roughly divided into purine and pyrimidine groups. The velocity of hydrolysis differs again in each group. This difference is especially marked in the pyrimidine group. Thus uracil nucleotide is much more rapidly hydrolyzed than cytosine nucleotide. In the purine group guanine nucleotide shows slightly weaker resistance to hydrolysis than adenine nucleotide.

Taking into account the difference in the behavior of individual nucleotides towards hydrolysis it is now possible to explain fully the process of hydrolysis of nucleic acid shown in Fig. 1. The purine nucleotides are hydrolyzed completely under conditions where more than 50% nucleic acid is hydrolyzed. Then phosphorus split off from yeast nucleic acid after 50% hydrolysis should belong to pyrimidine nucleotides. It was demonstrated in the

TABLE II. Hydrolysis of Nucleotides.
(Phosphorus-determination.)

0.66 gm. of guanine nucleotide (Na-salt) and 1.90 gm. of other nucleotides (brucine salt), 50 cc. of 12% HCl, 100°.

Nucleotide	Amount of phosphorus liberated	Time of hydrolysis (hr.)						
		0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
Guanine nucleotide	mg.	43.43	44.81	45.34	—	45.87	45.93	—
	%	94.6	97.5	98.7	—	99.8	100.7	—
Adenine nucleotide	mg.	18.09	31.08	39.25	40.51	40.66	—	—
	%	42.3	72.6	91.7	94.6	95.0	—	—
Uracil nucleotide	mg.	—	5.05	11.55	16.99	21.70	27.47	31.01
	%	—	10.8	24.7	35.4	46.5	58.8	66.4
Cytosine nucleotide	mg.	0.99	1.90	3.88	5.24	6.69	9.12	11.44
	%	2.3	4.3	8.7	11.8	15.1	20.6	25.8

following experiments that this was the case. In other words, the quantity of this pyrimidine-phosphorus of nucleic acid was equal to the sum of phosphorus actually liberated from each pyrimidine nucleotide. 1.9 gm. of the brucine salts of pyrimidine nucleotides were heated with 50 cc. of acid of the same strength as in the case of nucleic acid, and the quantities of phosphorus liberated were determined after an hour's hydrolysis. The results are shown in Table III. The percentage of liberation of the pyrimidine-phosphorus of nucleic acid is expressed as Pyrimidine Fraction I in column 3. On the other hand, the degree of hydrolysis of the two pyrimidine nucleotides, determined actually on each sample under the same conditions, are listed in columns 4 and 5. The values in these two columns are the quotients obtained by dividing the percentage of hydrolysis of pyrimidine nucleotides by 4. This calculation is based on the fact that phosphorus of each pyrimidine nucleotide occupies $\frac{1}{4}$ of the total phosphorus in nucleic acid. The sum of these values is expressed as Pyrimidine Fraction II in the last column. If the phosphorus liberated after 50% hydrolysis of nucleic acid comes really from pyrimidine nucleotides, Pyrimidine Fraction I should coincide with Fraction

TABLE III. Hydrolysis of Pyrimidine Fraction of Nucleic Acid under Different Conditions.

0.50 gm. of nucleic acid and 1.90 gm. of pyrimidine nucleotides,
50 cc. of acid.

Conditions of hydrolysis	Degree of hydrolysis (%)				
	Nucleic acid	Pyrimidine fraction I	Uracil nucleotide	Cytosine nucleotide	Pyrimidine fraction II
5% H ₂ SO ₄ , 110°, 1 hr.	56.9	6.9	5.5	1.6	7.1
5% H ₂ SO ₄ , 120°, 1 hr.	64.3	14.3	13.1	4.1	17.2
12% HCl, 130°, 1 hr.	75.1	25.1	21.0	6.8	27.8
15% HCl, 140°, 1 hr.	85.0	35.0	25.0	9.6	34.6

II. Table III shows that the values of Fraction I conform, within the limits to be expected, with those of Fraction II.

The results are also of interest in demonstrating that the turns of the curves which appear in the neighbourhood of the 80% point are due to the more rapid hydrolysis of uracil nucleotide than cytosine nucleotide. Thus after an hour's treating of nucleic acid with 15 or 12% hydrochloric acid at 140° or 130°, uracil nucleotide was completely or almost completely hydrolyzed while a large part of cytosine nucleotide remained still unhydrolyzed. The rate of hydrolysis should be subsequently retarded, as the resisting cytosine nucleotide is now solely involved in hydrolysis. The agents which hydrolyze uracil nucleotide cause simultaneously inevitable hydrolysis of cytosine nucleotide, though of a slighter degree. This is the reason why the curves turn in the neighbourhood of the 80% point instead of at 75% and why the hydrolysis-curves bent at higher points with the increasing strength of hydrolytic agents. The second turn at the 78.6% point which the curve showed after 4 hours' hydrolysis of nucleic acid with 5% sulphuric acid at 120° may be explained in the same way. Under these conditions, 89.7% uracil nucleotide and 29.9% cytosine nucleotide were hydrolyzed. The quotients of these values

divided by 4 are 22.4 and 7.5% respectively. The sum is then 29.9%, while the pyrimidine-phosphorus of nucleic acid is $78.6\% - 50\% = 28.6\%$.

By analogy the calculation was made on the data obtained in the experiments where the degree of hydrolysis of nucleic acid and two pyrimidine nucleotides with 12% HCl at 100°C was determined periodically. The results are summarized in Table IV. Here again the disparity in the values of Pyrimidine Fraction I and II is quite small.

TABLE IV. Periodical Hydrolysis of Pyrimidine Fraction of Nucleic Acid.

0.50 gm. of nucleic acid and 1.90 gm. of pyrimidine nucleotides,
50 cc. of 12% HCl, 100°C.

Time of hydrolysis (hr.)	Degree of hydrolysis (%)				
	Nucleic acid	Pyrimidine fraction I	Uracil nucleotide	Cytosine nucleotide	Pyrimidine fraction II
1.0	56.0	6.0	6.2	2.2	8.4
1.5	60.6	10.6	9.1	3.0	12.1
2.0	65.1	15.1	11.7	3.8	15.5
3.0	70.3	20.3	14.8	5.2	20.0
4.0	75.4	25.4	16.7	6.5	23.2

The next problem was to follow the hydrolysis of nucleotides by determining ribose set free. 0.66 gm. of guanine nucleotide and 1.9 gm. of other nucleotides were dissolved in 50 cc. of 12% hydrochloric acid and distilled until the last trace of furfural went into the distillate. A condensed summary of the results is given in Table V.

The velocity of hydrolysis was slower in this case as compared with the case where free phosphorus served as the indicator of hydrolysis of nucleotides. This difference in the speed of hydrolysis may be expected from the difficulty attending the complete conversion of ribose into furfural in a short time. Hoffman (l.c.) thought that the time required for the quantitative production of furfural from purine nucleotides and nucleosides was not

TABLE V. Hydrolysis of Nucleotides.

(Furfural-determination.)

0.56 gm. of guanine nucleotide and 1.90 gm. of other nucleotides,
50 cc. of 12% HCl, 100°C.

Nucleotide	Amount of furfural liberated	Time of hydrolysis (min.)									
		15	30	45	60	75	90	120	150	180	240
Guanine nucleotide	mg.	79.70	120.89	127.49	129.15	—	—	—	—	—	—
	%	55.9	84.8	89.4	90.6	—	—	—	—	—	—
Adenine nucleotide	mg.	50.65	79.65	92.91	104.42	110.39	114.08	—	—	—	—
	%	38.2	60.1	70.1	78.7	83.3	86.0	—	—	—	—
Uracil nucleotide	mg.	—	14.63	—	31.84	—	47.84	62.02	69.73	77.56	84.17
	%	—	10.1	—	22.0	—	33.0	42.8	48.1	53.5	58.1
Cytosine nucleotide	mg.	2.36	4.86	—	9.08	—	12.88	16.49	19.65	21.55	24.74
	%	1.7	3.5	—	6.6	—	9.4	12.0	14.3	15.7	18.0

to hydrolyze them, but rather to convert the free pentose formed into furfural. However, the question whether the liberation of phosphorus and ribose may take place with the same ease or not, remains as yet unsolved. It will be recalled in this connection that Jones and his associates (1917 iv; 1919 ii) pointed out the exceedingly slower liberation of phosphorus than purines, when purine nucleotides were hydrolyzed with 5% sulphuric acid at 100°.

The nucleotides kept the same order of resistance towards hydrolysis as in the cases of phosphorus determination.

IV. Hydrolysis of Nucleosides.

The results obtained by the application of Hoffman's method to hydrolysis of the nucleosides are given below (Table VI). For this purpose 0.40 gm. of the nucleosides was dissolved in 50 cc. of 12% HCl and distilled. Under these conditions the quantitative relationship between nucleosides and hydrolyzing acid corresponds to that in the case of hydrolysis of nucleotides.

TABLE VI. Hydrolysis of Nucleoside.
(Furfural-determination.)
0.40 gm. nucleoside, 50 cc. of 12% HCl, 100°C.

Nucleoside	Amount of furfural liberated	Time of hydrolysis (min.)							
		15	30	45	60	90	120	180	240
Guanosine	mg.	54.70	84.50	93.48	95.50	—	—	—	—
	%	44.0	67.9	75.2	76.7	—	—	—	—
Adenosine	mg.	44.82	70.91	86.34	99.51	111.75	—	—	—
	%	33.7	53.3	64.9	74.8	84.0	—	—	—
Uridine	mg.	—	14.86	—	32.38	48.42	62.42	78.02	83.76
	%	—	10.1	—	22.1	33.0	42.5	53.1	57.1
Cytidine	mg.	3.20	4.80	5.73	6.68	7.55	8.23	9.08	—
	%	2.2	3.3	3.9	4.6	5.2	5.6	6.2	—

According to their resistance against hydrolytic agents we can here again classify the nucleosides roughly into two groups: purine

and pyrimidine. In the purine group guanosine was more susceptible to hydrolysis than adenosine. This confirms Hoffman's observation made on purine nucleosides. In the pyrimidine group cytidine was distinctly more resistant towards hydrolysis than uridine. On comparison of the rate of furfural production it was found that nucleotides were always hydrolyzed a little more rapidly than corresponding nucleosides. It is, however, noticed in Hoffman's data that guanosine produces furfural with greater velocity than guanine nucleotide while this difference is hardly noticeable between adenosine and adenine nucleotide.

DISCUSSION.

The above facts, taken with those quoted in the introductory part of this paper, indicate clearly that the linkage between phosphoric acid and ribose of individual nucleotide is hydrolyzed by acid with different speed. Thus guanine nucleotide sets its phosphorus free with the greatest ease among four nucleotides. Adenine nucleotide comes next after guanine nucleotide in its susceptibility to hydrolysis. The liberation of phosphorus is exceedingly difficult in pyrimidine nucleotides, especially in cytosine nucleotide. With reference to the resistance of the linkage between ribose and nitrogenous compounds against hydrolysis no conclusive deduction can be drawn from the results obtained by determining the furfural production from nucleotides, because a combination of factors is operative for the liberation of pentose from nucleotide. One of these is the firmness of the bond between phosphorus and ribose, and the other is that of the linkage between ribose and the nitrogenous compounds. However, the state of the latter linkage is revealed by the determination of the rate of the furfural production from nucleosides. It was found in the present experiments that the order of the ease with which furfural was formed from nucleosides fell on the same line as in the case of phosphorus liberation from the nucleotides. It may now be justifiable to try to draw some deduction about the linkages between three components of nucleotides. The nucleotide, which has a firm bond between phosphorus and ribose, has also a solid one between ribose and nitro-

genous compounds. Both of these linkages of purine nucleotides, especially of guanine nucleotide are susceptible to hydrolytic agents. On the other hand pyrimidine nucleotides, particularly the cytosine nucleotide has the firmest linkages which can be hydrolyzed only with slow velocity. Thus the two sharp turns which the hydrolysis-curve of nucleic acid shows at the 50%, and round about the 80% point are fully explainable from the fact that purine nucleotides liberate their phosphorus completely at the 50% point and that uracil nucleotide is completely hydrolyzed in the neighbourhood of the 80% point while cytosine nucleotide still offers great resistance.

SUMMARY.

1. The resistance of adenine, guanine, uracil and cytosine nucleotides towards hydrolytic agents was compared one with another by determining the rate of the liberation of phosphorus and ribose. Guanine nucleotide was most susceptible to hydrolysis. Then came adenine, uracil and cytosine nucleotide in the order named.

2. On determining the rate of ribose liberation, four nucleosides were hydrolyzed just in the same order as in the cases of nucleotides.

3. By combining the results obtained from the studies on nucleotides and nucleosides, the process of the hydrolysis of nucleic acid was explained.

REFERENCES.

- Hoffman, W. S. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 15.
Jones, W. (1916): *J. Biol. Chem.*, **24**, iii.
Jones, W. (1920): *Amer. J. Physiol.*, **52**, 193.
Jones, W. and Germann, H. C. (1916): *J. Biol. Chem.*, **25**, 93.
Jones, W. and Kennedy, R. P. (1919): *J. Pharm. and Exp. Ther.*, **12**, 253.
Jones, W. and Kennedy, R. P. (1919): *J. Pharm. and Exp. Ther.*, **13**, 45.
Jones, W. and Read, B. E. (1917): *J. Biol. Chem.*, **29**, 111.
Jones, W. and Read, B. E. (1917): *J. Biol. Chem.*, **29**, 123.
Jones, W. and Read, B. E. (1917): *J. Biol. Chem.*, **31**, 39.
Jones, W. and Read, B. E. (1917): *J. Biol. Chem.*, **31**, 337.

- Kuttner, T. and Cohen, H. R. (1927): *J. Biol. Chem.*, **75**, 517.
Kuttner, T. and Lichtenstein, L. (1930): *J. Biol. Chem.*, **86**, 671.
Levene, P. A. (1918): *J. Biol. Chem.*, **33**, 229; 425.
Levene, P. A. and Jacobs, W. A. (1910): *Ber. chem. Ges.*, **43**, 3150.
Levene, P. A. and Jacobs, W. A. (1912): *Ber. chem. Ges.*, **45**, 608.
Steudel, H. and Peiser, E. (1922): *Z. physiol. Chem.*, **120**, 292.
Yamagawa, M. (1920): *J. Biol. Chem.*, **43**, 339.
Younburg, G. E. and Pucher, G. W. (1924): *J. Biol. Chem.*, **61**, 741.

STUDIEN ÜBER DIE PHYSIKALISCH-CHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN DES LECITHINS.

(Erste Mitteilung).

VON

YUJI SUEYOSHI UND KENKICHI KAWAI.

(Aus dem Mediz.-Chemischen Institut der Keio-Universität und
der Jikeikwai-Akademie, Tokyo.)

(Eingegangen am 5. Dezember 1931.)

I. EINLEITUNG.

Studien über die physikalisch-chemischen Eigenschaften des reinen Lecithins sind natürlich von grosser biochemischer Bedeutung, aber wir finden deren nur wenige in der Literatur. Das hat uns zu den folgenden Untersuchungen veranlasst, und zwar 1) über den isoelektrischen Punkt und 2) über die Flockung des Lecithins durch verschiedene Elektrolyten.

II. DER ISOELEKTRISCHE PUNKT DES LECITHINS.

Untersuchungsmaterial: Die Versuche wurden mit dem nach der Sueyoshischen Methode (1931) dargestellten Lecithin angestellt.

Untersuchungsmethode: Zu 11 ccm einer Pufferlösung, welche aus Milchsäure und Natrium Lactat oder aus Essigsäure und Natrium Acetat dargestellt war und verschiedenes Ph zeigte, wurde 1 ccm 1% wässrige Lecithinlösung zugesetzt, und auf die jeweilige Flockung des Lecithins untersucht. Die Resultate sind die der Tabelle I.

Aus den Resultaten kann man erkennen, dass die Lecithinlösung bei Ph 4,7 ein Flockungsoptimum zeigt. Daher entspricht der isoelektrische Punkt des Lecithins Ph 4,7, welcher Betrag im Vergleich zu den bisherigen Untersuchungsergebnissen Ph 1,7–2,9 (Feinschmidt, 1912; Fujii, 1924; Rona u. Deutsch, 1926; Zain, 1929, und Remesow, 1930), einen grossen Unterschied zeigt,

TABELLE I.
Flockungsgrad.

Ph	4.9	4.7	4.5	4.3	4.1	3.9
30'	—	+	—	—	—	—
60'	+	++	+	+	—	—
90'	++	+++	++	+	+	—

der darauf beruht, dass das bisher verwandte Material weniger rein war als mein Lecithin, und dass einige Materialien wahrscheinlich denaturiert waren, was aus den folgenden Untersuchungsergebnissen zu ersehen ist.

Eine 1%ige Lecithinlösung wurde in Bezug auf den isoelektrischen Punkt, wie oben erwähnt, nach längerem Stehen in Zimmertemperatur wieder untersucht. Daraus ergab sich folgendes:

Wie man aus Tabelle II sieht, das Lecithin wird schon in 4 Tagen einigermaßen denaturiert und sein isoelektrischer Punkt geht allmählich zum sauren Gebiet über, d.h. mit der Zeit erfolgt immer Denaturierung.

Dass der isoelektrische Punkt des bisher von vielen Autoren verwandten Lecithins mehr zur sauren Seite geneigt war, ist darauf zurückzuführen, dass die von ihnen gebrauchten Materialien (besonders käufliche Lecithine) wahrscheinlich schon denaturiert waren.

III. Flockung der Lecithinlösung durch Elektrolyten.

Die Flockung der Lecithinlösung durch Elektrolyten wurde zuerst von Koch (1930), dann von Porges und Neubauer (1908), neuerdings von Kakiuchi (1922) und von Rona u. Deutsch (1926) experimentell untersucht. Aber die Wirkungen der verschiedenen Ionen auf die saure und alkalische Seite des isoelektrischen Punktes waren noch nicht untersucht worden, was uns zu den folgenden Versuchen veranlasst hat.

Versuchsmethode: In jedes Reagensglas wurden 2 ccm einer 0,5% Lecithinlösung gegossen und dazu 2 ccm einer 1 molaren,

TABELLE II.

Flockungsgrad.

Ph	4.9	4.7	4.5	4.3	4.1	3.9	3.7	3.5	3.3	3.1	2.9	2.7	2.5	2.3
30'		+												
60'	+	+	+	+										
90'	++	+++	++	+	+									
nach 4 Tagen														
30'				+	++	+	+	+	+					
60'				+	++	+	+	+	+					
90'				+	++	+	+	+	+					
nach 15 Tagen.														
30'							+	+	+	+	+	+	+	+
60'							+	+	+	+	+	+	+	+
90'							+	+	+	+	+	+	+	+

dann allmählich stärker verdünnten Lösung der ein-, zwei und dreiwertigen Kationen oder Anionen hinzugetan und vermischt; 3 Minuten später wurde auf eine Lecithinflockung untersucht, ob sie in der saueren (Ph 2,9) oder in der alkalischen Seite (Ph 5,5) des isoelektrischen Punktes erfolgte.

Als eintertige Kationen wurden KCl, NaCl, als zweiwertige Kationen CaCl_2 , BaCl_2 , als dreiwertige Kation AlCl_3 , und als Anionen, die einwertigen, NaCl und KCl, als zweiwertiges, Na_2SO_4 , als vierwertiges, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ verwendet.

Die Resultate zeigt die Tabelle III.

TABELLE III.
Flockungszone.

Salz	Ph 5,5		Ph 3,9	
	obere Flockungszone	untere Flockungszone	obere Flockungszone	untere Flockungszone
NaCl	—	—	$\frac{m}{1}$	$\frac{m}{100}$
KCl	—	—	$\frac{m}{1}$	$\frac{m}{100}$
Na_2SO_4	—	—	$\frac{m}{40}$	$\frac{m}{800}$
BaCl_2	$\frac{m}{70}$	$\frac{m}{300}$	—	$\frac{m}{1}$
CaCl_2	$\frac{m}{700}$	$\frac{m}{2000}$	—	$\frac{m}{1}$
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	—	—	$\frac{m}{300}$	$\frac{m}{100000}$
AlCl_3	$\frac{m}{6500}$	$\frac{m}{7000}$	—	—

Aus dieser Tabelle kann man folgendes entnehmen:

1. Bei Ph 2,9 reagiert Na_2SO_4 empfindlicher als NaCl, KCl, und $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ am empfindlichsten, d.h. zweiwertige Anionen rufen eine stärkere Reaktion hervor als einwertige, und vierwertige die stärkste.

Aus obigen Ergebnissen ist es klar, dass das Lecithin bei Ph 2,9 d.h. auf der saueren Seite des isoelektrischen Punktes durch Anionen flockt, also positiv geladen ist.

2. Bei Ph 5,5 reagieren zweiwertige Kationen empfindlicher als einwertige, und dreiwertige stärker als zweiwertige, also schlägt sich das Lecithin auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes durch Kationen nieder, woraus zu ersehen ist, dass die Ladung negativ ist.

Dass das Lecithin beim Stehen allmählich denaturiert, erhellt auch daraus, dass die Lecithinlösung, wie oben erwähnt, mit der Zeit ihren isoelektrischen Punkt allmählich mehr auf die saure Seite wandern lässt. Da die Flockung des Lecithins durch Elektrolyten von der Konzentration der Wasserstoffionen sehr be-

TABELLE IV.

A. NaCl

Lecithinlösung.	$\frac{m}{1}$	$\frac{m}{5}$	$\frac{m}{8}$	$\frac{m}{10}$	$\frac{m}{15}$	$\frac{m}{20}$	$\frac{m}{30}$	$\frac{m}{40}$
nach d. Darstell. sofort.	+	+	+	+	+	+	+	+
n. d. Darstell. 10 Tage	+	+	+	+	+	-	-	-
n. d. Darstell. 20 Tage	+	+	-	-	-	-	-	-

 B. CaCl₂

Lecithinlösung.	$\frac{m}{1}$	$\frac{m}{8}$	$\frac{m}{20}$	$\frac{m}{30}$	$\frac{m}{40}$	$\frac{m}{80}$	$\frac{m}{100}$	$\frac{m}{140}$
nach d. Darstell. sofort.	+	+	-	-	-	-	-	-
n. d. Darstell. 10 Tage	+	+	-	-	-	-	-	+
n. d. Darstell. 20 Tage	+	+	-	-	+	+	+	+
n. d. Darstell. 30 Tage	+	+	-	+	+	+	+	+

Lecithinlösung.	$\frac{m}{200}$	$\frac{m}{400}$	$\frac{m}{600}$	$\frac{m}{1000}$	$\frac{m}{2000}$	$\frac{m}{3000}$	$\frac{m}{4000}$	$\frac{m}{5000}$
nach d. Darstell. sofort.	-	+	+	+	+	+	+	-
n. d. Darstell. 10 Tage	+	+	+	+	+	+	-	-
n. d. Darstell. 20 Tage	+	+	+	+	-	-	-	-
n. d. Darstell. 30 Tage	+	+	+	-	-	-	-	-

einflusst wird, so ist zu vermuten, dass auch die Lecithinlösung mit der Zeit eine Änderung ihrer Flockung durch Elektrolyten erleidet. Um dies zu bestätigen, haben wir die folgenden Versuche vorgenommen, welche darauf ausgingen, die Flockungsgrenze der Lecithinlösung durch Salze vor und nach dem eine gewisse Zeit lang Stehenlassen zu untersuchen. Die Resultate sind in Tabelle IV angegeben.

Die Tabellen IV A und IV B zeigen, dass zur Flockung des Lecithins durch NaCl die Lösung desto stärkere Konzentration haben muss, je länger sie stehengelassen wird, und dass auch die Flockung derselben durch CaCl allmählich weniger empfindlich wird, und die erste und zweite Zone der sog. unregelmässigen Flockung sich einander nähern. Aus obigen Ergebnissen kann man erkennen, dass bei Studien über Lecithinflockung die Verwendung des käuflichen Lecithins ein irrtümliches Resultat ergibt.

IV. SCHLUSS.

Aus der Zusammenfassung unserer Untersuchungsergebnisse erhellt folgendes:

1. Der isoelektrische Punkt des Lecithins entspricht Ph 4,7.
2. Der isoelektrische Punkt geht mit der Zeit auf die saure Seite über.

3. Auf der sauren Seite (z. B. Ph 2,9) des isoelektrischen Punktes wird das Lecithin durch Anionen geflockt, und zwar desto empfindlicher, je grössere Ionenwerte die letzteren haben; das Lecithin ist also positiv geladen.

4. Auf der alkalischen Seite (z. B. Ph 5,5) des isoelektrischen Punktes wird das Lecithin durch Kationen geflockt und reagiert desto empfindlicher, je grösser die Ionenwerte derselben sind. Also ist die Ladung des Lecithins negativ.

5. Das Lecithin wird gegen die Flockung durch Salze mit der Zeit allmählich unempfindlicher, und die erste und zweite Zone der unregelmässigen Fällung durch CaCl₂ kommen einander näher.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung des Vereins zur Erinnerung an das 300 jährige Jubiläum des *Toshogu* durchgeführt, dem dafür unser aufrichtiger Dank ausgesprochen sei.

LITERATUR.

- Feinschmidt (1912): Biochem. Z., **38**, 244.
 Fujii (1924): Journ. of Biochem., **3**, 393.
 Kakiuchi (1922): Journ. of Biochem., **1**, 165.
 Koch (1903): Z. f. physiol. Chem., **37**, 181.
 Porges u. Neubauer (1908): Biochem. Z., **7**, 152.
 Remesow (1930): Biochem. Z., **218**, 111.
 Rona u. Deutsch (1926): Biochem. Z., **171**, 89.
 Sueyoshi (1931): Journ. of Biochem., **13**, 145.
 Zain (1929): Arch. f. exper. Path. u. Pharmak., **146**, 78.

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

XII. On Sulphur Metabolism of Guinea Pigs Fed on a Vitamin C Free Diet.

By

SHINSUKE OHATA.

(From the Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo. Director: Prof. T. Nagayama.)

(Received for publication, December 7, 1931)

I. INTRODUCTION.

Florence's advocacy (1920) that scurvy and Barlow's disease are the result of a diet deficient in sulphur, has some approval for the reason that most scorbutic diet is insufficient in cysteine and that the sulphur content decreases when heated at high temperature, although there have been no experiments to ascertain his view. A. F. Morgan and A. Field (1929) proved that unsulphured dried peaches had no antiscorbutic properties while sulphured dried ones had nearly the same efficiency as fresh orange juice or tomatoes. E. Woods (1925) stated that cysteine had a curative efficiency on the disturbance of growth of animals. G. Moriquand, P. Michel and Milhond (1926) carried out an examination upon the sensitiveness to sulphuretted mineral water and reported that the first administration of sulphur or sulphides caused hemorrhagic scurvy in guinea pigs, which was however cured despite the continuance of the sulphurous diet. Thus, some investigators consider that the lack of sulphur in the diet gives rise to scurvy while some of them state that the administration of sulphur leads to this disease. Therefore, with the purpose to investigate the relation between sulphur and scurvy, the author has made the present experiment.

II. MATERIALS FOR THE EXPERIMENT.

A. *Animals and their diet.*

Guinea pigs weighing approximately 500 gms. were employed

for the present work. When the animals got used to the diet (Sherman's vitamin C free basal diet and radish roots), they were reared all together for several days, and separated into a metabolic cage. To each of them, besides Sherman's vitamin C free basal diet, for the first one week, fresh radish juice, for the supply of vitamin C, was given, and then the fresh radish juice was replaced by boiled juice for the scorbutic experiment.

B. *Collecting Feces and Urine.*

When the body weight of the guinea pigs became almost fixed, 48 hours' urine was collected. To prevent putrefaction, 1 cc. of toluene was previously added to the urine bottle which was put in a vacuum flask filled with ice. The metabolic cages were cleansed and dried every other two days. The volume, color, reaction of the urine and its specific gravity were examined. After filtration with absorbent cotton, the urine was made up to 200 ccm with distilled water. The whole feces collected every 48 hours were used for the experiment.

C. *The Extirpation of Organ Tissues.*

At the advanced stage of scurvy, the animals were lead to death by bleeding, cutting the carotid artery with care not to touch the sympathetic nerve. Right after the death of the animals, the lungs, heart, liver, spleen, kidneys, suprarenals, testicles, and muscles were extirpated. The fat and connective tissues were carefully removed. After the blood was wiped off thoroughly, each organ was weighed as a whole and preserved within a vessel filled with ice for the experiment.

III. *Autopsy Findings.*

The autopsy findings of the animals which we have used as a scorbutic group for the determination of sulphur contents in each organ tissue are as follows: No. 113 showed a notable looseness of the teeth, hypertrophy of costal cartilage, accompanied with hemorrhages around the rib junction. In No. 119, hypertrophy of costal cartilage, looseness of the teeth, and remarkable hemorrhages

at caecum and suprarenals, were seen. No. 117 presented loosened teeth, swelling of rib junction, hemorrhages at suprarenals and joints. No. 120, there were exhibited loosening of the teeth, hypertrophy of costal cartilage, significant hemorrhages at caecum, duodenum, and abdominal wall, and blood was often found in the feces.

No. 142 showed such symptoms as looseness of the teeth, ulcer in duodenum, and hemorrhages at caecum and joints. When they were still alive, bloody stools often appeared. In No. 141, loosened teeth, hypertrophy of costal cartilage, hemorrhages at caecum were observed. No. 144 indicated looseness of teeth, hypertrophy of costal cartilage, hemorrhages at duodenum, caecum and joints. Bloody stools were often eliminated during the survival of the animal. In No. 143, there were recognised loosened teeth, hypertrophy of costal cartilage, hemorrhages at caecum and duodenum and congestion of the left kidney and several times bloody stools were found.

IV. EXPERIMENTAL PROCEDURE.

1. *Quantitative Determination of Sulphur Content in Organs.*

For the quantitative determination of sulphur contents in each organ tissue, Benedict's method (1909), having been improved in some points, was adopted. The determination was carried out in the following manner. Each organ extirpated from animals in the manner mentioned above, was weighed. Then a certain amount of each organ was measured and minced in a porcelaine evaporating dish to which 30% caustic potash was added. Then it was covered with a glass shade and heated for 30 minutes on a water bath. When all the contents were thoroughly dissolved, the solution was slightly acidified with nitric acid. Then Benedict's sulphur reagent was added carefully. The solution was heated over a free flame so that there could be no loss through spattering. When dryness was reached, the flame was blackened. Then the flame was turned up to full heat to decompose the

organic substances. All unoxidised sulphur constituents were oxidised with sulphuric acid. Then it was precipitated with barium chloride in usual manner. After being filtered through ash-free filter paper, in a weighted porcelaine crucible, it was ignited and measured.

2. *Quantitative Determination of Sulphur Content in Feces, Urine, and Diet.*

48 hours' urine was made up to 200.0 ccm with distilled water. Then 50 ccm of it was evaporated to 10 ccm. Then the total amount of sulphur in it was determined by Benedict's method. The Feces preserved in 95% alcohol, was desiccated at 50°C and powdered. 0.5g of it was used for the determination. Benedict's sulphur reagent was added and heated on water bath. When the entire contents were thoroughly dissolved, the amount of total sulphur was determined by Benedict's method which had been somewhat improved.

The determination of the sulphur content in the diet was also performed in the same way as in the case of the feces. At 50–60°C the diet was desiccated and powdered. 0.5 g of it was used for the determination.

V. RESULTS OF THE EXPERIMENT.

1. *The Result in Each Organ Tissue.*

The sulphur contents in organ tissues as heart, lung, liver, spleen, kidney, suprarenal, testicle, and muscle of normal and scorbutic guinea pigs are shown in Table I, and II. The average percentages are indicated in Table III and are also shown with curve in Fig. 1.

It is obvious from the data given in Table I, II and Fig. 1 that the sulphur contents in each organ tissue of the scorbutic animal are almost the same as that of normal animal with the only exception in lungs where there can be seen an increase by 32% in scorbutic side. Recently it has been reported by Mori (1923) that the function of the lung is not only limited to respiration but

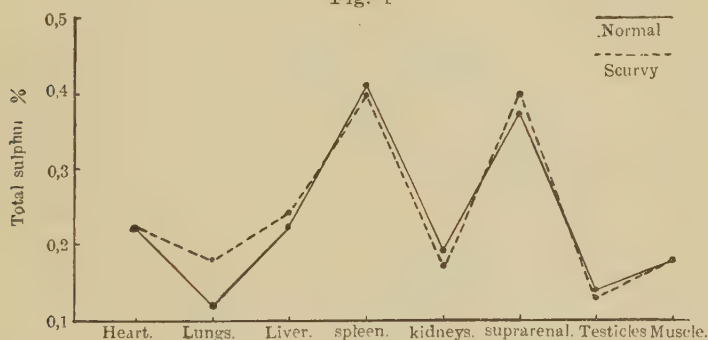
TABLE II.
Sulphur Content in Various Organ Tissues of Scorbatic Guinea Pig.
of Normal or Scorbatic Guinea Pig.

No. of animal	Date	Body Wt.		Heart		Lung		Liver		Spleen		Kidney		Suprarenal		Testicle		Muscle	
		Initial	Final	Wt.	S.	Wt.	S.	Wt.	S.	Wt.	S.	Wt.	S.	Wt.	S.	Wt.	S.	Wt.	S.
		gm	gm	gm	%	gm	%	gm	%	gm	%	gm	%	gm	%	gm	%	gm	%
113	22/X	415	370	1.20	0.2336	2.60	0.1887	12.95	0.2123	0.40	0.4680	3.40	0.1638	0.30	0.4637	1.00	0.1625	2.00	0.1769
119	24/X	525	325	0.98	0.2691	2.22	0.1594	7.75	0.2741	0.37	0.4279	3.30	0.1810	0.40	0.4508	1.75	0.1307	2.00	0.1769
117	25/X	475	365	1.11	0.2388	2.78	0.1930	9.21	0.2205	0.34	0.3889	2.93	0.1679	0.38	0.3480	1.06	0.0975	2.00	0.1549
116	28/X	560	385	1.63	0.1905	3.63	0.2151	15.40	0.2542	0.36	0.3521	3.31	0.1797	0.76	0.3403	2.59	0.1274	2.00	0.2188
142	16/XII	410	305	1.21	0.2292	3.35	0.2040	11.60	0.2329	0.30	0.4442	3.33	0.1838	0.55	0.3447	2.12	0.1257	2.00	0.1401
141	17/XII	415	300	1.13	0.1994	3.80	0.2163	9.50	0.2501	0.37	0.2971	3.56	0.1648	0.46	0.4352	1.11	0.1634	2.00	0.1766
144	18/XII	450	340	1.33	0.2179	2.36	0.1889	12.95	0.2343	0.30	0.4273	3.46	0.1803	0.26	0.5179	2.08	0.1099	2.00	0.1986
143	19/XII	425	315	1.03	0.2561	2.08	0.1349	7.18	0.2768	0.20	0.4603	3.56	0.1972	0.49	0.3253	1.45	0.1506	2.00	0.2192
Maximum		550	385	1.63	0.2691	3.80	0.2162	15.40	0.2768	0.40	0.4680	3.56	0.1972	0.76	0.5179	2.59	0.1634		0.2192
Minimum		410	300	0.98	0.1905	2.08	0.1349	7.18	0.2123	0.20	0.2971	2.93	0.1638	0.26	0.3253	1.00	0.0975		0.1401
Average		459	338	1.203	0.2293	2.82	0.1875	10.81	0.2444	0.33	0.4082	3.36	0.1773	0.45	0.4032	1.6	0.1335		0.1828

TABLE III.
Percentages of Increased or Decreased Sulphur Contents in Organ Tissues
of Normal or Scorbutic Guinea Pig.

	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Suprarenal	Testicle	Muscle
Normal	0.2298	0.1269	0.2201	0.4149	0.1966	0.3748	0.1475	0.1842
Scurvy	0.2293	0.1875	0.2444	0.4082	0.1773	0.4032	0.1335	0.1828
Difference in %	0	+32.5	+10	-1.5	-10	+7	-9.5	-1

Fig. 1



it acts for regulation of the content of lipins in blood. He states that various lipins, diffused from the intestinal canal into lymphatic systems, flow into the left subclavian vein and as soon as they pass through the lungs from the heart, the proportion of lipins in the blood becomes normal. On the other hand, the fact that there is seen an increase of sulphur content in the lung of the scorbutic animal in the present experiment is of much interest from the points of view that there may be a close connection between sulphur and lipin metabolism and that fatty acid in blood, as will be seen in the next paper, invariably increases in the course of scurvy.

2. Diet Ingested and Its Sulphur Contents.

The amounts of food ingested in each two days of scorbutic and normal periods, and the sulphur contents are given in Table IV.

According to Table IV, the amount of ingested food decreases

TABLE IV. Total Sulphur in Two Days Diet Ingested.

Date		1/XII		3/XII		5/XII		7/XII		9/XII		11/XII	
Body wt.		S.		S.		S.		S.		S.		S.	
Initial	Final	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm
gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm
415	300	56	0.0969	58	0.0960	58	0.0960	49	0.0848	33	0.0571	50	0.0866
410	305	53	0.0918	47	0.0824	55	0.0952	58	0.0960	55	0.0952	49	0.0848
425	315	43	0.0727	44	0.0773	45	0.0789	45	0.0789	39	0.0675	38	0.0658
450	340	53	0.0918	52	0.0901	54	0.0935	38	0.0658	49	0.0848	58	0.0960

13/XII		15/XII		17/XII		19/XII		Average amount of two days diet ingested and its sulphur content				Difference	
S.		S.		S.		S.		Normal		Scurvy		S.	
Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm	Total diet ingested	gm
gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	%	%
48	0.0831	41	0.0719	34	0.0589	—	—	57.3	0.0963	42.5	0.0737	—26	—23.5
26	0.0450	27	0.0407	—	—	—	—	51.7	0.0898	43.0	0.0723	—17	—19.0
39	0.0675	43	0.0727	37	0.0641	41	0.0719	44.0	0.0763	40.3	0.0698	—8	—8.5
48	0.0831	39	0.0675	19	0.0329	—	—	53.0	0.0918	41.8	0.0710	—21	—22.7

Remarks: Fed with scorbutic diet from 7/XII.

in the scorbutic period as compared with that in normal period. Consequently the sulphur content in the former is somewhat small.

3. *The amount of each two day feces and its sulphur content in scorbutic and normal periods are as indicated in Table V.*

As shown in Table V, the average amount of two days feces in normal period is 3.85 gm. and 3.77 gm. in scorbutic period. The sulphur content in feces is indicated by 0.0207 mg. in normal while by 0.0232 mg. in scurvy. The latter is somewhat larger.

4. *Total Sulphur In Two Days' Urine.*

The volume of two days urine and its total sulphur are as in Table VI.

According to the above Table VI, the volume of two days' urine averages 56.9 cc. in normal and 40.5 cc. in scurvy. Namely, in scurvy there is seen a slight decrease. The sulphur content on an average is 46.38 gm. in normal and 37.55 gm. in scurvy, i.e., a decrease in scurvy.

5. *Sulphur Balance in Scorbutic Period.*

The average of total sulphur balance for two days is shown in Table VII(1) and Table VII(2).

As is recognized in Table VII(1) and Table VII(2), the ratio of the average sulphur content in foods ingested within two days to the excreted sulphur is 75.8% in normal while in scurvy it is indicated by 84.8%. The total sulphur balance is +24.2% in normal, but in scurvy it is slightly small, i.e., +15.2%.

6. *The Ratio of Sulphur in Urine to Sulphur Absorbed in the Course of Scorbutic Period.*

The ratio of sulphur in urine to sulphur absorbed in each two days in both normal and scorbutic periods is indicated in Table VIII(1) and Table VIII(2).

As seen in Tables VIII(1) and VIII(2), ca. 80% of sulphur absorbed is eliminated in the urine of scorbutic animal while in

TABLE V. Total Sulphur in Two Days Feeces.

Date		1/XII		3/XII		5/XII		7/XII		9/XII		11/XII	
Body wt.		Total wt. of feces		Total wt. of feces		Total wt. of feces		Total wt. of feces		Total wt. of feces		Total wt. of feces	
Initial	Final	gm	S.	gm	S.	gm	S.	gm	S.	gm	S.	gm	S.
gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm	gm
141	415	300	5.00	0.0270	0.0185	5.06	0.0276	4.94	0.0250	3.51	0.0193	3.89	0.0162
142	410	305	4.35	0.0232	0.0088	4.50	0.0346	4.90	0.0267	5.83	0.0398	4.39	0.0236
143	425	315	2.45	0.0116	0.0083	3.35	0.0189	4.24	0.0237	3.80	0.0182	3.80	0.0188
144	450	340	3.80	0.0202	0.0223	4.90	0.0267	2.43	0.0141	4.33	0.0233	5.87	0.0314

13/XII		15/XII		17/XII		19/XII		Average amount of two days feces and its sulphur content				Difference	
Total wt. of feces		Total wt. of feces		Total wt. of feces		Total wt. of feces		Normal		Scurvy		Total wt. of feces	
S.		S.		S.		S.		Total wt. of feces		S.		Total wt. of feces	
gm		gm		gm		gm		gm		gm		%	
6.04	0.0356	0.82	0.0030	4.00	0.0339	—	—	5.25	0.0244	3.87	0.0222	— 26	— 9.0
2.45	0.0225	1.77	0.0178	—	—	—	—	3.57	0.0222	3.87	0.0261	+ 8	+ 15.0
4.19	0.0230	3.01	0.0123	0.52	0.0022	3.40	0.0256	2.42	0.0129	3.28	0.0191	+ 36	+ 32.5
6.32	0.0397	3.46	0.0250	1.99	0.0187	—	—	4.16	0.0231	4.07	0.0254	— 2	+ 9.0

Remarks: Fed with scorbutic diet from 7/XII.

TABLE VI. Total Sulphur in Two Days Urine.

No. of animal	Date		1/XII		3/XII		5/XII		7/XII		9/XII		11/XII	
			Body wt.		Urine Volume		S.		Urine Volume		S.		Urine Volume	
	Initial	Final	cc.	gm	cc.	gm	cc.	gm	cc.	gm	cc.	gm	cc.	gm
	gm	gm												
141	410	300	95	0.0496	49.5	0.0469	40.5	0.0518	43	0.0183	40.5	0.0407	35.5	0.0326
142	410	305	88	0.0417	35	0.0565	83	0.0328	63	0.0339	83	0.0493	33	0.0347
143	425	315	87	0.0481	48	0.0566	58	0.0468	90.5	0.0523	58	0.0525	58	0.0432
144	450	340	38	0.0362	37	0.082	23	0.0467	31	0.0623	23	0.0324	40.5	0.0382

13/XII	15/XII		17/XII		19/XII		Average volume of two days urine excreted and its sulphur content				Difference	
	Urine Volume		Urine Volume		Urine Volume		Normal		Scurvy		Urine Volume	
	S.		S.		S.		Urine Volume		S.		Urine Volume	
	cc.	gm	cc.	gm	cc.	gm	cc.	gm	cc.	gm	cc.	%
38	0.0360	0.0217	24	0.0186	—	—	61.7	0.0509	33.6	0.0330	—45.5	—35
27.5	0.0355	0.0200	—	—	—	—	69.0	0.0437	41.1	0.0353	—36	—19
46	0.0409	0.0329	39	0.0300	41	0.0289	64.0	0.0505	52.4	0.0401	—18.5	—20.6
49	0.0422	0.0377	23	0.0377	—	—	33.0	0.0404	31.8	0.0418	—2.81	+ 3.5

Remarks: Fed with scorbutic diet from 7/XII.

Normal

TABLE VII(1).

No. of animal	Diet-S	Urine-S	Feces-S	Urine-S + Feces-S	Rate of Excreted S to diet-S
	gm	gm	gm	gm	%
141	0.0963	0.0509	0.0244	0.0753	78.2
142	0.0898	0.0437	0.0222	0.0359	73.4
143	0.0763	0.0505	0.0129	0.0334	83.1
144	0.0918	0.0404	0.0231	0.0635	69.2
Maximum	0.0963	0.0509	0.0244	0.0753	83.1
Minimum	0.0763	0.0404	0.0129	0.0634	69.2
Average	0.0886	0.0464	0.0207	0.0670	75.8

Scurvy

TABLE VII(2).

No. of animal	Diet-S	Urine-S	Feces-S	Urine-S + Feces-S	Rate of Excreted S to diet-S
	gm	gm	gm	gm	%
141	0.0727	0.0330	0.0222	0.0552	74.8
142	0.0723	0.0353	0.0261	0.0261	84.9
143	0.0698	0.0401	0.0191	0.0592	84.8
144	0.0710	0.0418	0.0254	0.0672	94.6
Maximum	0.0737	0.0418	0.0261	0.0672	94.6
Minimum	0.0698	0.0330	0.0191	0.0552	74.8
Average	0.0717	0.0376	0.0232	0.0608	84.8

Normal

TABLE VIII(1).

No. of animal	Diet-S	Feces-S	Absorbed-S	Urine-S	Rate of Urine-S to absorbed-S
	gm	gm	gm	gm	%
141	0.0963	0.0244	0.0719	0.0509	70.8
142	0.0898	0.0222	0.0676	0.0437	64.6
143	0.0763	0.0129	0.0634	0.0505	79.7
144	0.0918	0.0231	0.0658	0.0404	61.4
Maximum	0.0963	0.0244	0.0719	0.0509	79.7
Minimum	0.0763	0.0129	0.0634	0.0404	61.4
Average	0.0886	0.0207	0.0672	0.0464	69.1

Scurvy

TABLE VIII(2).

No. of animal	Diet-S	Feces-S	Absorbed-S	Urine-S	Rate of Urine-S to absorbed-S
	gm	gm	gm	gm	%
141	0.0737	0.0222	0.0471	0.0330	70.0
142	0.0723	0.0261	0.0463	0.0353	76.2
143	0.0698	0.0191	0.0493	0.0401	81.4
144	0.0710	0.0254	0.0464	0.0418	90.0
Maximum	0.0737	0.0261	0.0493	0.0418	90.0
Minimum	0.0698	0.0191	0.0463	0.0330	70.0
Average	0.0717	0.0232	0.0473	0.0376	79.4

control ca. 70% is excreted. It may be due to the splitting of the tissue proteins in scurvy.

7. *The ratio of sulphur in feces to sulphur in food ingested is shown in Table IX(1) and Table IX(2).*

As in Table IX(1) and IX(2), the average ratio of two days is 23% in normal period, and 32.4% in scorbutic period. From this fact, if sulphur once absorbed is not excreted again in the intestinal canal, the absorption of sulphur in scurvy is somewhat disturbed as compared with the normal period.

Normal

TABLE IX(1).

No. of animal	Diet-S	Feces-S	Rate of Feces-S to Diet-S
	gm	gm	%
141	0.0963	0.0244	25.3
142	0.0898	0.0222	24.7
143	0.0763	0.0129	16.9
144	0.0918	0.0231	25.2
Maximum	0.0963	0.0244	25.3
Minimum	0.0763	0.0129	16.9
Average	0.0886	0.0207	23.0

Scurvy

TABLE IX(2).

No. of animal	Diet-S	Feces-S	Rate of Feces-S to Diet-S
	gm	gm	%
141	0.0737	0.0222	30.1
142	0.0723	0.0261	36.1
143	0.0696	0.0191	27.4
144	0.0710	0.0254	35.8
Maximum	0.0737	0.0261	36.1
Minimum	0.0698	0.0191	27.4
Average	0.0717	0.0232	32.4

SUMMARY.

From the above results, the author has reached the following conclusions:

1. The total sulphur contents in various organs of scorbutic guinea pigs are not so different from the normal ones with the only exception of an increase in the amount in lungs.

2. The average amount of each two days' rations ingested by the animals is less in scurvy when compared with the control. Accordingly the amount of total sulphur ingested in scurvy is also less than that in normal.

3. The average amounts of two days' feces are nearly the same in both normal and scorbutic animals, and the sulphur content in the scorbutic seems to be somewhat larger.

4. In the scorbutic period, the average volume of each two days' urine is less than that in normal conditions. The amount of sulphur excreted in the urine of the former is also decreased.

5. Total sulphur balance is positive in both normal and scorbutic periods, but in the latter it is relatively small.

6. The ratio of sulphur in urine to total sulphur absorbed is somewhat larger in scurvy. This fact may be due to the splitting of tissue proteins in scurvy.

7. The ratio of sulphur in feces to that in the diet ingested

is larger in scurvy than that in the control. It shows that the absorption of total sulphur from the digestive canal is somewhat disturbed in scurvy.

8. In scurvy although there are recognised some changes in sulphur metabolism, they are so slight that it is not proper to consider them directly as an actual cause of the scurvy.

REFERENCES.

- Benedict, S. (1909): J. Biol. Chem., **6**, 363.
Florence (1920): Schweiz. Rundsch. Med., **20**, 417.
Morgan, A. F. and Field, A. (1929): J. Biol. Chem., **82**, 579.
Mori, H. (1924): Tokyo-Igakkai-Zasshi, **38**, No. 1, 15.
Mouriquand, Michel and Milhoud (1926): C. r. Soc. Biol., **94**, 64.

Additional Writing:

We are indebted to Count Mutsu and Baron Takagi for the expense of this work, which have been defrayed from Ujun-Kwai.

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

XIII. Contribution to the Study on Sulphur Metabolism of Guinea Pigs Fed on a Vitamin C Free Diet.

By

SHINSUKE OHATA.

(From the Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Jikei-kwai Medical College, Tokyo. Director: Prof. T. Nagayama.)

(Received for publication, December 19, 1931)

INTRODUCTION.

In a previous paper (1932), we reported the result of experiments on the sulphur metabolism of guinea pigs fed on a vitamin C free diet. In these experiments we were not able to find any marked difference between the sulphur metabolism in normal and scorbutic animals. Therefore we concluded that we cannot agree with Frolence's observation (1920) that lack of sulphur in the rations gives rise to scurvy in guinea pigs. However, we found that the absorption of sulphur in scorbutic animals is slightly disturbed as compared with that in the control ones and that the rate of total sulphur excreted in urine to the sulphur absorbed in scurvy, is somewhat higher than that in the control. In these experiments, however, we simply estimated all the sulphur excreted in urine as total sulphur. In the present work, besides the total sulphur, the amount of various kinds of sulphur, such as total sulphate, inorganic sulphate, and ethereal sulphate, in the urines of both normal and scorbutic animals were determined.

EXPERIMENTS.

Animals employed for the experiment are guinea pigs weighing from 400 to 500 gm. As a vitamin C free diet, Sherman's ration is used. Cautions in feeding animals and collecting urine are required as explained in previous paper (1932). Throughout

the experiment, generally the animals had a good appetite except for a slight loss shown in the advanced stage of scurvy. For the present experiment, Benedict's method (1909) for total sulphur and Folin's method (1905) for total inorganic and ethereal sulphates were used and their amounts were indicated as SO_3 . Every two days urine used for the determination was previously diluted with distilled water to 100 ccm.

RESULTS.

With these seven guinea pigs reared under the conditions described above, we made a quantitative determination of various kinds of sulphur in urine. The results are indicated in the following tables, I, II, III, IV, V, VI, and VII.

The average rate of each amount of sulphur to the total sulphur in urines of both normal and of scorbutic guinea pigs is seen in table VIII.

According to the above tables, the amount of total sulphur in urine is almost the same in both normal and scurvy. Yet the neutral sulphur always increases in the scorbutic period while almost without exception ethereal sulphate decreases.

SUMMARY.

With seven animals, the amount of sulphur, neutral sulphur, total- SO_4 , inorganic- SO_4 , ethereal- SO_4 , in each two days' urine are determined. The results obtained from twenty-one times of determinations in normal period, and those of fifty-two times in scorbutic period, are respectively averaged as follows:

	Normal period (as SO_3 in gm.)	Scorbutic period (as SO_3 in gm.)
1. Total sulphur	0.0761	0.0746
2. Neutral sulphur	0.0093	0.0158
3. Total sulphate	0.0668	0.0588
4. Inorganic sulphate	0.0514	0.0523
5. Ethereal sulphate	0.0154	0.0064

TABLE I.

Date	Body Wt.		Amt. of Two Day Urine		Reaction	Specific Gravity		Total Sulphur (SO ₂)		Neutral Sulphur (SO ₃)		Total Sulphate (SO ₄)		Inorganic Sulphate (SO ₂)		Ethereal Sulphate (SO ₃)	
	gm.		ccm.			gm.		gm.		gm.		gm.		gm.		gm.	
Normal period 20/VIII 22 24 26 28 30 1/IX 3 5 7	440		35.0		Alkaline	1.033		0.0772		0.0078		0.0894		0.0508		0.0186	
	445		25.0		"	1.036		0.0736		0.0070		0.0666		0.0473		0.0193	
	455		17.5		"	1.040		0.0787		0.0086		0.0701		0.0488		0.0213	
	450		21.0		"	1.040		0.0866		0.0144		0.0522		0.0317		0.0205	
	440		18.5		"	1.056		0.0801		0.0126		0.0475		0.0422		0.0053	
	415		20.0		"	1.053		0.0619		0.0107		0.0512		0.0453		0.0059	
	410		21.0		"	1.056		0.0871		0.0201		0.0670		0.0612		0.9659	
	385		18.5		"	1.060		0.0885		0.0238		0.0647		0.0580		0.0067	
	345		25.0		"	1.045		0.0964		0.0237		0.0727		0.0584		0.0143	
	320		21.0		"	1.050		0.0683		0.0134		0.0549		0.0528		0.0021	
Average in Normal Period								0.0765		0.0078		0.0687		0.0490		0.0197	
Average in Scorbutic Period								0.0756		0.0170		0.0586		0.0499		0.0087	

TABLE II.

Date	Body Wt.	Amt. of Two Day Urine	Reaction	Specific Gravity	Total Sulphur (SO ₃)	Neutral Sulphur (SO ₃)	Total Sulphate (SO ₄)	Inorganic Sulphate (SO ₃)	Ethereal Sulphate (SO ₃)
	gm.	cm.			gm.	gm.	gm.	gm.	gm.
20/VIII Normal period	445	47.5	Alkaline	1.032	0.0852	0.0116	0.0736	0.0500	0.0236
	455	42.0	"	1.024	0.0854	0.0126	0.0728	0.0505	0.0223
	465	50.0	"	1.026	0.0841	0.0108	0.0733	0.0483	0.0250
	465	43.0	"	1.028	0.0808	0.0111	0.0497	0.0448	0.0049
28 30 1/IX Scurbutic period	455	54.0	"	1.032	0.0684	0.0146	0.0538	0.0463	0.0075
	450	52.0	"	1.036	0.0824	0.0201	0.0623	0.0519	0.0104
	450	26.0	"	1.042	0.0718	0.0196	0.0522	0.0491	0.0031
	450	25.0	"	1.046	0.0718	0.0162	0.0556	0.0553	0.0003
5 7 9 Scurbutic period	405	28.0	"	1.046	0.0800	0.0257	0.0543	0.0524	0.0019
	370	27.0	"	1.044	0.0769	0.0203	0.0566	0.0525	0.0041
	330	20.0	"	1.050	0.0683	0.0136	0.0547	0.0532	0.0015
Average in Normal Period					0.0849	0.0117	0.0732	0.0496	0.0236
Average in Scurbutic Period					0.0726	0.0177	0.0549	0.0507	0.0042

TABLE III.

Date	Body Wt.		Amt. of Two Day Urine	Reaction	Specific Gravity	Total Sulphur (SO ₂)		Neutral Sulphur (SO ₂)		Total Sulphate (SO ₂)		Inorganic Sulphate (SO ₃)		Ethereal Sulphate (SO ₂)	
	gm.	gm.	ccm.			gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.	gm.
21/VIII Normal period 23 25	440		60.0	Alkaline	1.023	0.0909	0.0134	0.0775	0.0635	0.0140					
	445		61.0	"	1.022	0.0966	0.0104	0.0862	0.0638	0.0224					
	460		74.0	"	1.020	0.0917	0.0152	0.0765	0.0556	0.0209					
	465		65.0	"	1.028	0.0731	0.0148	0.0583	0.0537	0.0046					
	470		72.0	"	1.024	0.0813	0.0200	0.0613	0.0533	0.0080					
31 Scurbutic period 2/IX 4 6 8	435		97.0	"	1.026	0.1067	0.0233	0.0834	0.0600	0.0234					
	435		46.0	"	1.040	0.1035	0.0254	0.0781	0.0639	0.0142					
	385		63.0	"	1.032	0.1019	0.0321	0.0698	0.0661	0.0037					
	365		40.0	"	1.036	0.0861	0.0208	0.0653	0.0580	0.0073					
	320		35.0	"	1.036	0.1005	0.0269	0.0736	0.0714	0.0021					
Average in Normal Period						0.0930	0.0130	0.0800	0.0609	0.0191					
Average in Scurbutic Period						0.0933	0.0233	0.0700	0.0609	0.0091					

TABLE IV.

Date	Body Wt.	Amt. of Two Day Urine	Reaction	Specific Gravity	Total Sulphur (SO ₃)	Neutral Sulphur (SO ₃)	Total Sulphate (SO ₄)	Inorganic Sulphate (SO ₃)	Ethereal Sulphate (SO ₂)
	gm.	ccm.			gm.	gm.	gm.	gm.	gm.
{ 21/VIII Normal period	460	39.0	Alkaline	1.031	0.0646	0.0070	0.0576	0.0556	0.0020
	460	22.0	"	1.033	0.0769	0.0090	0.0679	0.0530	0.0149
	460	21.0	"	1.035	0.0700	0.0068	0.0632	0.0556	0.0076
	445	18.4	"	1.030	0.0624	0.0070	0.0554	0.0473	0.0081
{ 27 29 31 Scorbutic period	445	37.0	"	1.036	0.0742	0.0123	0.0619	0.0569	0.0050
	425	22.5	"	1.040	0.0618	0.0146	0.0472	0.0467	0.0005
	410	20.0	"	1.042	0.0719	0.0145	0.0574	0.0557	0.0017
	390	22.0	"	1.043	0.0714	0.0086	0.0638	0.0583	0.0045
{ 2/IX 4 6 8 Scorbutic period	375	17.5	"	1.045	0.0744	0.0149	0.0595	0.0501	0.0094
	350	16.0	"	1.050	0.0799	0.0163	0.0636	0.0597	0.0039
Average in Normal Period					0.0705	0.0076	0.0629	0.0547	0.0082
Average in Scorbutic Period					0.0709	0.0126	0.0583	0.0535	0.0048

TABLE V.

Date	Body Wt. gm.	Amt. of Two Day Urine ccm	Reaction	Specific Gravity	Total Sulphur (SO ₃)		Neutral Sulphur (SO ₃)		Total Sulphate (SO ₃)		Inorganic Sulphate (SO ₃)		Ethereal Sulphate (SO ₃)	
					gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	gm.	gm.	gm.	gm.
{ 11/IX Normal period { 13 15 17 19 21 13 25 27 29 1/X Scurbutic period	465	30.0	Alkaline	1.048	0.0914		0.0140		0.0774		0.0613		0.0161	
	455	31.0	"	1.042	0.0836		0.0118		0.0718		0.0585		0.0133	
	455	35.0	"	1.042	0.0899		0.0115		0.0784		0.0656		0.0128	
	470	27.5	"	1.045	0.0785		0.0090		0.0695		0.0538		0.0157	
	470	37.0	"	1.045	0.0812		0.0079		0.0733		0.0613		0.0120	
	470	36.5	"	1.046	0.0841		0.0110		0.0731		0.0618		0.0113	
	465	30.0	"	1.044	0.0745		0.0131		0.0614		0.0587		0.0027	
	450	48.0	"	1.040	0.0847		0.0160		0.0687		0.0664		0.0023	
	440	30.0	"	1.050	0.0936		0.0246		0.0690		0.0607		0.0083	
	395	33.0	"	1.046	0.0984		0.0219		0.0765		0.0739		0.0026	
	365	32.5	"	1.047	0.0980		0.0172		0.0808		0.0691		0.0117	
Average in Normal Period					0.0883		0.0124		0.0759		0.0618		0.0141	
Average in Scurbutic Period					0.0866		0.0151		0.0715		0.0632		0.0083	

TABLE VII.

Date	Body Wt.		Amt. of Two Day Urine		Reaction	Gravity Specific	Total Sulphur (SO ₃)		Neutral Sulphur (SO ₂)		Total Sulphate (SO ₄)		Inorganic Sulphate (SO ₃)		Ethereal Sulphate (SO ₂)	
	gm.		ccm.				gm.		gm.		gm.		gm.		gm.	
Normal period 12/IX 14 16 18 20 22 24 26 28 30 2/X	465		50.0		Alkaline	1.025	0.0579		0.0059		0.0520		0.0416		0.0104	
	470		77.0		"	1.022	0.0584		0.0057		0.0527		0.0416		0.0111	
	465		55.0		"	1.024	0.0522		0.0050		0.0472		0.0378		0.0094	
	470		55.0		"	1.030	0.0639		0.0074		0.0595		0.0522		0.0073	
	445		56.0		"	1.032	0.0563		0.0108		0.0455		0.0448		0.0007	
	450		59.0		"	1.024	0.0555		0.0089		0.0466		0.0460		0.0006	
	445		30.0		"	1.032	0.0446		0.0094		0.0352		0.0341		0.0011	
	430		36.0		"	1.036	0.0415		0.0082		0.0333		0.0313		0.0020	
	415		36.0		"	1.030	0.0425		0.0108		0.0317		0.0316		0.0001	
	395		45.5		"	1.032	0.0583		0.0089		0.0494		0.0403		0.0091	
	360		20.0		"	1.052	0.0391		0.0068		0.0323		0.0315		0.0008	
Average in Normal Period						0.0562		0.0056		0.0506		0.0403		0.0103		
Average in Scorbutic Period						0.0506		0.0089		0.0417		0.0390		0.0027		

TABLE VIII.

Ratio	Normal	Scorbutic	Difference %
$\frac{\text{Neutral-S}}{\text{Total-S}}$	0.1222	0.2116	+73.3
$\frac{\text{Total-SO}_4}{\text{Total-S}}$	0.8778	0.7882	-10.2
$\frac{\text{Inorganic-SO}_4}{\text{Total-S}}$	0.6741	0.7011	+4
$\frac{\text{Ethereal-SO}_4}{\text{Total-S}}$	0.2024	0.0858	-57.6

CONCLUSIONS.

1. The amount of neutral sulphur is increased in the urine of guinea pigs fed on a vitamin C free diet. The increase of the rate of total sulphur excreted in urine to the absorbed sulphur, as shown in scorbutic period, is mainly due to the increase of neutral sulphur.

2. The amount of ethereal sulphate in the urine is decreased in scorbutic animals.

REFERENCES.

- Benedict (1909): J. of Biolog. Chem., **6**, 363.
 Florence (1920): Schweiz. Rundsch. Med., **20**, 417.
 Folin (1905): J. of Biolog. Chem., **1**, 131.
 Ohata, S. (1932): J. of Biochem., **15**, 285.

Additional writings:

We are indebted to Count Mutsu and Baron Takagi for the expenses of this work, which have been defrayed from Ujun-Kwai.

A NOTE ON THE HAGEDORN-JENSEN'S METHOD OF BLOOD SUGAR DETERMINATION IN CASE OF PHLORHIZIN DIABETES.

By

SUSUMU YAMADA.

*(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. K. Kodama.)*

(Received for publication, December 24, 1931)

It is a well known fact that phlorhizin causes glycosuria in frogs and other cold-blooded animals as well as in warm-blooded ones. But it was observed by v. Mering (1886) that phlorhizin glycosuria was always associated with hypoglycemia. He, therefore, suggested as a possible explanation that the kidney might be affected so as to eliminate more sugar than usual.

Minkowski (1893) assumed that phlorhizin decomposes in the kidney into phloretin and phlorose, of which the latter, being identical with glucose, is eliminated rapidly into urine, while the former unites with sugar in the animal body to form the glycosid, which again will be broken up in the kidney. Phloretin acts, therefore, as sugar transporter from various parts of the body to the kidney.

Levene (1894), who also confirmed the hypoglycemia in phlorhizin diabetes, is of opinion, that there is active production of sugar in the kidneys of phlorhizinized animals.

Junkersdorf (1923) reports that, nearly all of the animals, rendered hypoglycemic by starvation and phlorhizin administration, showed a rise of sugar with the discontinuance of phlorhizin.

In striking contrast to these observations are findings of Coolen (1895), Pavy (1896) and Biedl and Kolisch (1900).

Coolen observed, in all cases, a marked rise in blood sugar concentration after phlorhizin administration, which seemed to be more intense when animals were nephrectomised.

Biedl and Kolisch estimated the blood sugar in rabbits and found always an apparent increase in its amount. In harmony

with these results are the data obtained by Pavy, who observed the higher figures of blood sugar in the majority of phlorhizinized cats. They sought the explanation of these conflicting results in the fact that the blood sugar was determined at different intervals after the phlorhizin injection. Namely, the blood sugar estimations were performed by v. Mering, Minkowski and others many hours after phlorhizin administration, whereas their own were completed at the relatively early stage when the first appearance of the glycosuria was noticed.

However, the methods employed by these investigators are not free from criticism.

So Lewandowski (1901) offered the following argument that "big venesections give rise to blood sugar concentration in normal animals. Therefore, the findings made by these authors, in which the consideration of this fact lacked, must have lead to false results."

With regard to the blood sugar concentration in phlorhizinized animals, Lewandowski himself is also of the same opinion as v. Mering, Minkowski and the others.

After all these conflicting results, it has been acknowledged by many authors that there is no longer question that phlorhizin glucosuria is accompanied by a definite and characteristic hypoglycemia.

However, more recent observation made by the present author himself, in which the change in blood sugar concentration after phlorhizin administration was followed for several hours, using more improved technique, brought again the conclusion that, contrary to the conviction of many authors, phlorhizin makes animals hyperglycemic in almost all cases.

Under mature consideration of this contradiction between the earlier findings of v. Mering, Minkowski and many others and the results of the author himself, it seems very likely that it may be traced back to the difference in the methods employed in the estimations of blood sugar.

Some experiments, therefore, were performed to ascertain this question.

TABLE I.

Authors	Methods	Blood used in Analysis	Phlorhizin administered gm.	Blood Sugar		Animals
				Control	Phlorhizin	
v. Mering	Fehling	50 cc.	8-10 (per os)		6-8 hrs. after Ph. administ. 0.09 0.095 0.082	dogs
Minkowski	Fehling	50 cc.	0.5- (subcut)	direct before Ph. inj. 0.097	5 hrs. after Ph. injection 0.077	dogs
				before Ph. injection. 0.120 0.170 0.101	one days after Ph. injection 0.089 0.109 0.106	
Levene	Fehling	20 gm.	1-2 (subcut)			dogs
Junkerslorf	Bang	100-200 mg.	3-4 (subcut)	before Ph. inj. 0.100	2-8 hrs. after Ph. injection (every day) 0.066 0.070 0.068	dog
				4-6 days after Ph. inj. 0.090 0.107 0.098		
Lewandowski	Alihn-Meissel	20-30 cc.	0.15-0.3 (subcut)	1-2 days after Ph. inj. 0.134 0.195 0.178	direct after Ph. injection 0.041 0.106 0.057	rabbits
Pavy	Fehling	no description	0.5 (subcut)		after Ph. inj. 0.156 0.138 0.128 0.183	cats

METHODS.

The details of the earlier investigations and the methods employed are summarised in Table I.

It will be seen from the table that the methods of sugar estimation applied in the earlier investigations were those of reduction of copper salt. While, in the work of the present author himself, Hagedorn-Jensen technique, i. e., ferrieyanide reduction method was used. The given experimental details were followed strictly, except that instead of using micropipette (0.1 cc.), blotting paper was employed to obtain the blood. In some cases, Bang's method of blood sugar estimation was also used on the same sample of blood with the object of comparing the ferrieyanide method with that of copper salt.

EXPERIMENTAL RESULTS.

1. *Changes in blood sugar after phlorhizin administrations, observed with Hagedorn-Jensen technique.*

1 or 2 gm. of the glucosid were injected into the rabbits, dissolved in 2.4 per cent Na_2CO_3 solution (20 cc. of this solution for 1 gm. phlorhizin), or olive oil (7 cc. of this oil for 1 gm. phlorhizin). After the intervals as shown in the figure, the blood was collected from the ear vein, under utmost precautions not to disturb the animal.

One of the typical examples is shown in Fig. 1.

2. *Comparison of the results obtained on the same animal with Hagedorn-Jensen technique and Bang's method. (Fig. 2)*

From these experiments we see that, the blood sugar figures soon after phlorhizin administration showed a decided rise, which lasted for two hours with Hagedorn-Jensen technique, whereas this was not the case with Bang method. With both methods, however, it fell into subnormal value three hours after the injection.

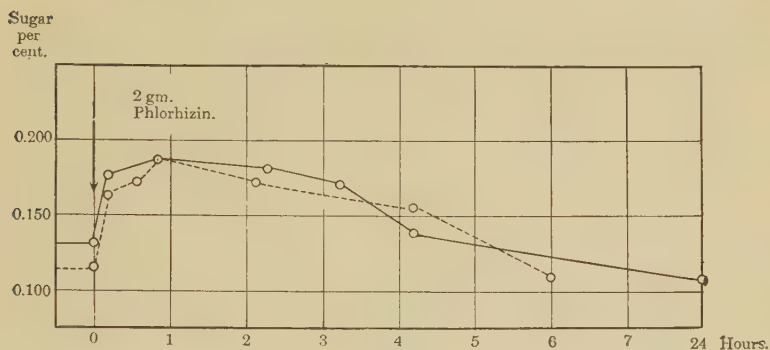


Fig. 1. Curves showing the change in blood sugar after phlorhizin injection, estimated with Hagedorn-Jensen technique.
 -----○----- Rabbit No. 36, ♀ 1.94 kg. 2 gm. phlorhizin dissolved in 40 cc. of 2.4% Na_2CO_3 -solution, was administered subcutaneously at 9.30 a.m., 25/IX 1927.
 —○— Rabbit No. 42, ♀ 2.05 kg. 2 gm. phlorhizin dissolved in 14 cc. of olive oil was injected at 10.50 a.m., 29/X 1927.

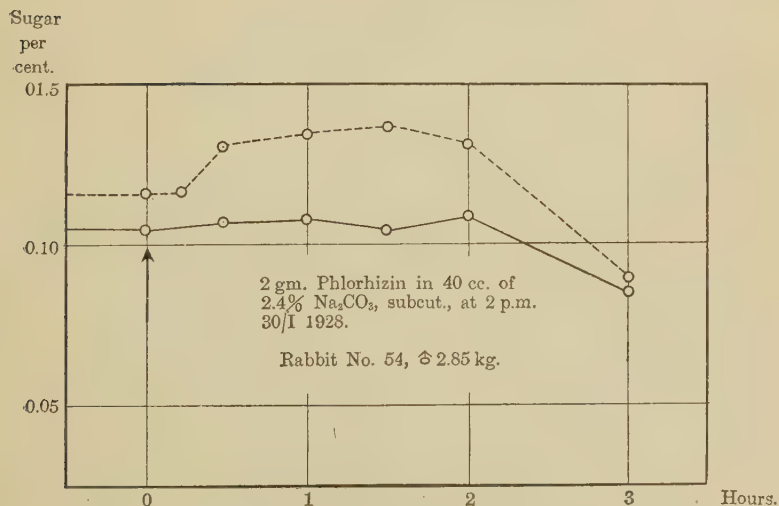


Fig. 2. Blood sugar curves after phlorhizin injection, -----○-----, estimated with Hagedorn-Jensen technique, —○—, obtained with Bang method.

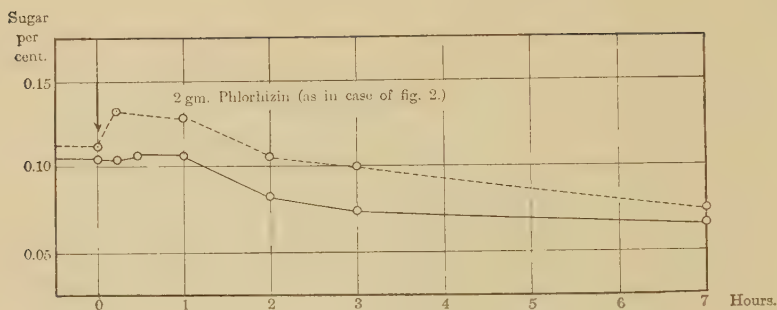


Fig. 3. The same as fig. 2. Rabbit No. 55, ♀ 3.15 kg.

As the intensity of hyperglycemia in each case depended simply upon the amount of phlorhizin administered, and also as it appeared soon after the injection, it seems very probable that this phenomenon was caused by the glucosid itself or its cleavages, which appeared in the blood. If this is really the case, we expect that these substances should be positive against the Hagedorn and Jensen's method, but not for the Bang's.

3. Qualitative tests on the reducing power of phlorhizin.

The reducing power of phlorhizin and phloroglucin as its cleavage were tested against various sugar reagents. The results are shown in Table II.

TABLE II.

	Trommer	Haines	Fehling	Benedict	Nylander	AgNO ₃ +HN ₄ OH
Phlorhizin	—	—	—	—	—	—
Phloroglucin 1 % sol.	—	+	±	—	±	+
Conc. sol.	+	+	+	+	±	+

Here it must be noted that, phlorhizin as well as phloroglucin reduces ferricyanide already at room temperature, suggesting that they give higher value with Hagedorn-Jensen's method than with the other. This is precisely the case as shown in the following table, where more quantitative comparisons are recorded.

4. *Reduction values of phlorhizin and phloroglucin
calculated as glucose.*

TABLE III.

	Hagedorn-Jensen	Bang
1 mg. Phlorhizin	0.75 mg. Glucose	0.06-0.07 mg. Glucose
1 mg. Phloroglucin	0.6 mg. Glucose	0.3 mg. Glucose

CONCLUSION.

It may be concluded, therefore, that the injection of phlorhizin causes a false hyperglycemia in animals, if Hagedorn-Jensen method is applied in the estimation of blood sugar, owing to the high sensitiveness of the method against the glucosid; while with Bang's method this is very inconsiderable.

SUMMABY.

1. Phlorhizin reduces ferricyanide already at an ordinary temperature, while it does not reduce Cu_2OH_2 even under heating.

2. Phlorhizin reacts with iodine, resulting in a certain loss of it, when estimated with thiosulphate.

3. The apparent hyperglycemia produced by phlorhizin, when the ferricyanide method is used in the blood sugar determinations, is due chiefly to the high sensitiveness of the reagent against phlorhizin and perhaps also against the decomposition products of the glucosid. Phlorhizin hyperglycemia observed with Hagedorn-Jensen's technique is, therefore, a false hyperglycemia, which can not be proved with Bang's method.

It is a pleasure to acknowledge the kindly criticism of Professor K. Kodama throughout this work.

BIBLIOGRAPHY.

- Biedl, A. and Kolisch, R. (1900): *Verhandl. Kong. inn. Med.*, **18**, 573.
Bang, L.: *Mikromethoden zur Blutuntersuchung*, München, 1922.
Coolen, F. (1895): *Arch. Pharm.*, **1**, 267.
Hagedorn, C. H. and Jensen, N. (1923): *Biochem. Zeitschr.*, **135**, 46.
Junkersdorf, F. (1923): *Pflüger's Arch.*, **197**, 500; **207**, 433.
Levene, P. A. (1894-95): *J. Physiol.*, **17**, 259.
Lewandowski, F. (1901): *Arch. f. Physiol.*, 365.
v. Mering, I. (1886): *Verhandl. Kong. inn. Med.*, **5**, 185.
v. Mering, I. (1888, 1889): *Z. klin. Med.*, **14**, 405; and **16**, 431.
Moritz, F. and Prausnitz, W. (1890): *Z. f. Biol.*, **27**, 81.
Minkowski, O. (1893): *Arch. f. exper. Path. u. Pharm.*, **31**, 85.
Nash, T. P., Jr. (1922): *J. Biol. Chem.*, **51**, 171.
Pavy, F. W. (1896): *J. Physiol.*, **20**, 19.

ÜBER DAS VERHALTEN DER FETTE BEI DER BEBRÜTUNG VON HÜHNEREIERN.

VON

KENZO KUSUI.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie
in Nagasaki. Vorstand: Prof. M. Tomita.)*

(Eingegangen am 8. Januar 1932)

Vor mehreren Jahren haben Tangl und Farkas (1908) durch ihre wertvollen kolorimetrischen Untersuchungen den Begriff der Entwicklungsarbeit eingeführt. Es hat sich dabei herausgestellt, dass bei der Entwicklung des Hühnereies etwa zwei Drittel der gesamten verbrauchten chemischen Energie als solche zum Aufbau des Embryos dienen, und dass ein Drittel als Entwicklungsarbeit in andere Energiearten umgewandelt wird. Es hat sich ferner ergeben, dass in den Anfangsstadien der Embryogenese zur Entwicklung der lebenden embryonalen Substanz die Umwandlung einer grösseren Menge chemischer Energie erforderlich ist als zur Entwicklung derselben Substanzmenge in den reiferen Stadien, und dass die zur Entwicklungsarbeit im Hühnerei nötige Energie hauptsächlich aus dem chemischen Energievorrat des Eifettes geschöpft wird.

Systematische Untersuchungen in bezug auf die chemischen Veränderungen der Eifette liegen dagegen sehr wenige vor. Es ist also nicht ohne Interesse zu untersuchen, ob das Fett sich während der Bebrütung in seiner Zusammensetzung und Eigenschaft gleichmässig verhält, oder ob es dabei Veränderungen erfährt. Wenn von diesem Standpunkte aus die Zusammensetzung irgend eines Eifettes etwa in Hinsicht auf Fettabbau und Fettaufbau untersucht wird, so muss man ein möglichst vollständiges und übersichtliches Bild von der Art und relativen Menge der Komponenten des genannten Fettes gewinnen. Um diese Verhältnisse näher zu beleuchten, beabsichtigte ich durch Ermittlung der Kennzahlen von Bamberger (1927), die sich ja alle nur auf Fettsäuren

beziehen, die genannten Verhältnisse in einer einzigen Einheit auszudrücken und dann die einzelnen Komponenten mit der Gesamtzahl der Fettsäuren zu vergleichen.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

I. Bambergers Kennzahlen der Fette von frischen und bebrüteten Hühnereiern.

Zur Isolierung der Fette wurden 10 Stück von frischen bzw. 3 Tage, 5 Tage, 7 Tage, 9 Tage, 14 Tage, 17 Tage und 19 Tage lang bebrüteten Eiern in siedendem Wasser 30 Minuten lang gekocht, der Eiinhalt gut zerrieben und mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Ätherextrakt wurde mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet, destilliert und im Exsiccator evakuierend stehen gelassen, bis das Gewicht konstant wurde. An jedem Präparat wurden die wichtigen Kennzahlen nach Bamberger (1927) ermittelt.

Die Befunde kann man in Kürze folgendermassen tabellarisch zusammenfassen:

TABELLE I.
Prozentzusammensetzung.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Fett- gehalt in 10 Eiern g	Gesamte Fett- säure %	Freie Fett- säuren %	Flüchtige wasser- lösliche Fettsäuren %	Flüchtige wasser- unlösliche Fettsäuren %	Doppel- bindungen in % der Carboxyl- gruppen
Frisch	58,3	100	1,9	0,3	0,1	88,8
3	53,3	100	3,0	0,3	0,1	89,0
5	55,0	100	2,2	0,3	0,4	91,6
7	50,0	100	2,0	0,3	0,1	93,7
9	54,0	100	1,8	0,2	0,2	93,1
14	48,0	100	1,7	0,2	0,06	87,1
17	45,0	100	0,9	0,2	0,1	89,5
19	36,0	100	0,9	0,1	0	92,1

Blickt man auf die Tabellen I u. II, so fällt eine erhebliche Abnahme des Gesamtfettes in den späteren Entwicklungsstadien

TABELLE II.
Millimolzahl der Fettsäuren.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Fett- gehalt in 10 Eiern g	Millimol der Fettsäuren in 1 g Fett				
		Gesamte Fett- säure %	Freie Fett- säuren %	Flüchtige wasser- lösliche Fettsäuren %	Flüchtige wasser- unlösliche Fettsäuren %	Ungesät- tigte Fettsäuren %
Frisch	58,3	3,44	0,067	0,012	0,004	3,058
3	53,3	3,41	0,109	0,010	0,006	3,037
5	55,0	3,40	0,075	0,010	0,013	3,117
7	50,0	3,40	0,068	0,010	0,005	3,190
9	54,0	3,39	0,063	0,008	0,007	3,159
14	48,0	3,33	0,058	0,007	0,002	2,927
17	45,0	3,32	0,031	0,007	0,006	2,973
19	36,0	3,31	0,031	0,006	0	3,049

und eine beträchtliche Zunahme der freien Fettsäuren nach 3 tägiger Bebrütung auf.

II. Vergleich der chemischen Zusammensetzung der Fette des Embryos mit der des übrigen Inhaltes von 14 bzw. 17 Tage lang bebrüteten Hühnereiern.

Die Frage, wie eine Mobilisierung des Fettes im Eiinhalt und seine Überführung in den werdenden Embryo stattfindet, steht noch offen. Zur Untersuchung dieser Frage verwendete ich als Untersuchungsmaterial 14 Tage bzw. 17 Tage lang bebrütete Eier. Die Embryos wurden von dem übrigen Eiinhalt getrennt und jeder Teil mit Alkohol versetzt, dann über Nacht stehen gelassen. Der Alkoholextrakt wurde unter vermindertem Druck zum Trocknen eingeeengt und dann mit Äther aufgenommen (Ätherextrakt I.). Der Alkoholrückstand wurde mit Maschine zerkleinert, getrocknet und gut pulverisiert, dann mit Äther im Soxhletschen Apparat erschöpfend extrahiert (Ätherextrakt II.). Nach Trocknen mit gegluhtem Natriumsulfat wurden die Ätherextrakte (I. und II.) destilliert und im CaCl_2 -Exsiccator evakuierend stehen gelassen, bis das Gewicht konstant wurde.

TABELLE III.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Materials g	Erhaltene Fettmenge g	Auf 1 Stück berechnete Fettmenge g
14	55	A. Eiinhalt ohne Embryos 1973	263,0	4,78
		B. Embryos 450	9,6	0,17
17	36	C. Eiinhalt ohne Embryos 899	134,5	3,73
		D. Embryos 710	31,9	0,88

An den oben erwähnten 4 Präparaten (A. B. C. D.) wurden die wichtigen Kennzahlen nach Bamberger ermittelt.

Die Resultate sind aus folgenden Tabellen ersichtlich:

TABELLE IV.
Prozentzusammensetzung.

Präparat	Gesamte Fettsäure %	Freie Fettsäuren %	Flüchtige wasser- lösliche Fettsäuren %	Flüchtige wasser- unlösliche Fettsäuren %	Doppel- bindungen in % der Carboxyl- gruppen
A	100,0	1,9	0	0,07	87,7
B	100,0	9,7	0,9	0,20	110,1
C	100,0	1,0	0	0,18	80,4
D	100,0	5,3	0,3	0,21	104,2

TABELLE V.
Millimolzahl der Fettsäuren.

Präparat	Millimol der Fettsäuren in 1 g Fett				
	Gesamte Fettsäure %	Freie Fettsäuren %	Flüchtige wasser- lösliche Fettsäuren %	Flüchtige wasser- unlösliche Fettsäuren %	Ungesät- tigte Fettsäuren
A	3,30	0,064	0	0,002	2,895
B	2,97	0,290	0,028	0,006	3,269
C	3,38	0,034	0	0,006	2,717
D	2,90	0,152	0,009	0,006	3,021

ZUSAMMENFASSUNG.

1. In den späteren Entwicklungsstadien tritt eine erhebliche Abnahme des Gesamtfettes ein.

2. Bei 3 tägiger Bebrütung erreicht die Menge der freien Fettsäuren ihren Maximalbetrag.

3. Die Menge der freien Fettsäuren im Embryo des 14 Tage lang bebrüteten Hühnereies beträgt im Vergleich mit deren Menge im übrigen Eiinhalt ungefähr das 5-fache. In derselben Relation nimmt die Menge der freien Fettsäuren bei weiterer Bebrütung ab.

4. Die Fettsäuren des Hühnereies bestehen hauptsächlich aus ungesättigten Fettsäuren.

Weitere Untersuchungen über die Isolierung und die Charakterisierung der einzelnen Eifette in den verschiedenen Entwicklungsstadien sind im hiesigen Institut im Gang.

LITERATUR.

Bamberger, P. (1927): *Bioch. Zs.*, **190**, 247.

Farkas, K. (1906): *Pflügers Arch.*, **98**, 490.

Tangl, F. (1903): *ebenda*, **93**, 327.

Tangl, F. u. Farkas, K. (1908): *ebenda*, **104**, 173.

BEITRÄGE ZUR EMBRYOCHEMIE DER REPTILIEN.

VON

MASAJI TOMITA UND MITARBEITERN.

(Ausgeführt mit Mitteln der Kaiserlichen Akademie zur Förderung der Wissenschaften.)

IX. Über das Verhalten des Ovovitellins bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies.

VON

KENZO KUSUI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie in Nagasaki.)

(Eingegangen am 8. Januar 1932)

Von den verschiedenartigen Vitellinen, welche als einer der Hauptbestandteile des Eidotters betrachtet werden, ist bis jetzt nur das der Hühnereier eingehender untersucht worden. Sein Gehalt an Aminosäuren ist annähernd durch zahlreiche Abbauprobversuche festgestellt. Wir legten uns nun die Frage vor, ob die Vitelline anderer Tierarten vom Hühnervitellin verschieden sind, oder aber dieselben Bausteine und auch in denselben Mengenverhältnissen besitzen.

Unsere Untersuchung hatte den Zweck, einerseits den Gehalt des Vitellins des Meerschildkröteneies an verschiedenen lebenswichtigen Aminosäuren kennen zu lernen, und andererseits die Frage zu klären, ob das Vitellin sich während der Bebrütung in seiner Zusammensetzung und seinen Eigenschaften ganz gleichmässig verhält, oder ob es dabei Veränderungen erfährt. Wir untersuchten zunächst befruchtete Eier vor ihrer Bebrütung auf ihren Gesamtgehalt an Hexonbasen, Tyrosin, Cystin und Tryptophan. Dieselben Aminosäuren wurden dann am 14. Tage und am 30. Tage der Bebrütung und teilweise am Tage des Ausschlüpfens des Embryos ermittelt. Es wird im allgemeinen angenommen, dass bei der Raschheit, mit welcher der Eiweissstoffwechsel des bebrüteten Eies abläuft, keine

Neubildung von Aminosäuren stattfindet. Diese Annahme konnte durch unsere Untersuchung sicher bestätigt werden.

Experimentelle Belege.

I. DER GEHALT AN OVOVITELLIN IM FRISCHEN UND BEBRÜTETEN EI DER MEERSCHILDKRÖTE.

Der grosse Gehalt an Ovovitellin im Eidotter kann eine besondere Bedeutung haben, und da die Vitellinmenge, wie die folgende Tabelle veranschaulicht, in der letzten Hälfte der Bebrütung eine starke Abnahme erfährt, so schien die Möglichkeit vorhanden, dass diese Substanz vornehmlich zu den Nährstoffen des sich hochentwickelnden Embryos gehören könne.

TABELLE I.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eidotters g	Menge des Ovovitellins in 1 Ei g
Frisch	100	1050	3,60
14	100	1180	3,66
30	100	1090	2,58
45	100	230	0,66

II. ZUSAMMENSETZUNG DES OVOVITELLINS IN DEN VERSCHIEDENEN BEBRÜTUNGSPERIODEN.

A. Elementaranalyse.

Mit Präparaten von frischem Ei bzw. 14 Tage und 30 Tage lang bebrütetem Ei wurden C, H und N in bekannter Weise analysiert. Die aschenfrei berechneten Zahlen sind in Tabelle II. niedergelegt.

TABELLE II.

Präparat aus	C %	H %	N %
frischen Eiern	49,26	8,05	12,87
14 Tage lang bebrüteten Eiern	49,62	8,09	13,15
30 Tage lang bebrüteten Eiern	49,64	8,03	13,21

B. Spaltungsprodukte.

1. *Versuch der Säurehydrolyse.*

Das Präparat aus frischen bezw. 14 Tage, 30 Tage und 45 Tage lang bebrüteten Eiern wurde mit einer Mischung was konzentrierter Schwefelsäure im dreifachen Gewicht und Wasser im sechsfachen Gewicht 14 Stunden lang rückflusskühlend gekocht. Das Hydrolysat wurde von Humin durch Filtration und Auswaschen befreit. Das Filtrat wurde zuerst mit Barytwasser, und dann mit Baryumcarbonat sorgfältig neutralisiert. Der entstandene Niederschlag von schwefelsaurem Barium wurde abgesaugt und gründlich ausgewaschen. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck auf 200 ccm eingedampft, mit Schwefelsäure versetzt, bis der Prozentgehalt 5% Schwefelsäure betrug, und dann mit Phosphorwolframsäure gefällt.

Von dem Filtrat wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt und als Stickstoff von durch Phosphorwolframsäure nichtfällbarer Natur festgestellt.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit Baryt zerlegt, und das überschüssige Baryt durch Kohlensäure abgeschieden. Das von Bariumcarbonat abfiltrierte Filtrat wurde unter vermindertem Druck auf ein bestimmtes Volumen eingeeengt. Mit einem aliquoten Teil wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Das übrige Filtrat wurde mit Salpetersäure angesäuert und dann mit 20%iger Silbernitratlösung gefällt. Die Silberfällung musste die Purinbasen aufnehmen.

An dem Filtrat der Silberfällung wurde das Silberbarytfällungsverfahren nach Kossel und Kutscher (1900–1901) ausgeführt. Der Silberbarytniederschlag wurde in Wasser suspendiert, mit Schwefelsäure angesäuert und dann mit Schwefelwasserstoff behandelt. Danach wurde die von Baryt und Silber befreite Flüssigkeit unter vermindertem Druck auf ein bestimmtes Volumen eingeeengt. An einem aliquoten Teil wurde der Stickstoff nach Kjeldahl ermittelt. Aus der übrigen Flüssigkeit wurde die Histidinfraktion von der Argininfraktion getrennt. Nach der Stickstoffbestimmung einer jeden Fraktion wurde das Histidin als

Pikrolonat und das Arginin als Pikrat gefällt. Das Filtrat der Silberbarytffällung wurde durch Schwefelsäure von Baryt und durch Schwefelwasserstoff von Silber befreit. Nach Ermittlung des Stickstoffgehaltes von diesem Filtrat wurde das Lysin mit alkoholischer Pikrinsäurelösung gefällt.

Die Resultate sind im folgenden tabellarisch mitgeteilt:

TABELLE III.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Humin- stick- stoff %	N-Menge von durch P-Wo-Säure		Purin- stick- stoff	N-Menge in		
		fällbar. Natur %	nicht fällbar. Körp. %		Histidin- fraktion %	Arginin- fraktion %	Lysin- fraktion %
Frisch	0,0408	3,785	6,143	0,0052	0,1633	0,8391	1,9708
14	0,1248	3,214	6,071	0,0050	0,1572	0,7938	1,7550
30	0,1982	3,772	6,000	0,0010	0,1663	0,8165	1,9824
45	0,2749	4,263	6,220	0,0181	0,1630	0,8040	2,4247

TABELLE IV.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Histidin- pikrolonat g	Argininpikrat g	Lysinpikrat g
Frisch	0,20	2,4	3,9
14	0,20	2,1	3,5
30	0,20	2,3	3,8
45	0,16	2,3	4,9

2. Der Gehalt der verschiedenen Präparate an Tryptophan, Tyrosin und Cystin samt Cystein.

a) Zur Ermittlung des Tryptophangehaltes wurde das colorimetrische Verfahren von O. Fürth (1920) angewandt, welches auf einer von Voisenet angegebenen Farbenreaktion beruht.

Eine genau gewogene Menge von jedem Präparat wurde mit Chloroformwasser durchgerührt, mit Natriumcarbonat schwach

alkalisch gemacht und mit 0,5 g Trypsin (Kahlbaum) vermischt, auf 100 ccm aufgefüllt und unter Zusatz von Toluol bei 37°C im Brutschrank zur Verdauung angesetzt.

Um nun den Tryptophangehalt zu ermitteln, wurde das Digerat nach Ablauf von 8 Tagen filtriert und, parallel der Ausführung der Standardreaktion aus einer 0,1 proz. Tryptophanlösung, zugleich in ganz analoger Weise die Reaktion mit 2,0 ccm des Filtrates ausgeführt.

b) Eine genau gewogene Menge von jedem Präparat wurde mit der 5-fachen Menge konzentrierter Salzsäure 12 Stunden lang unter Rückflusskühlung hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde sodann in eine Schale übergespült, im Wasserbade fast zum Trocknen gebracht und in 50 ccm Wasser aufgenommen. Nun wurde die Lösung mit 20% Phosphorwolframsäure (Kahlbaum) versetzt. Nach 2 Tagen wurde scharf abgenutscht und daraufhin dreimal mit (mit Salzsäure angesäuerter) verdünnter Phosphorwolframsäurelösung nachgewaschen. Es fiel noch ein grobgeballter Niederschlag aus, der abfiltriert wurde. Das Gesamtvolumen des farblosen, wasserhellen Filtrates betrug 250 ccm, wovon 100 ccm weiter verarbeitet wurden. Die Behandlung wurde nach den Angaben von O. Fürth und Fleischmann (1922) ausgeführt, und das Tyrosin durch das Bromadditionsverfahren bestimmt.

c) Ein jedes Präparat wurde genau gewogen und mit 3-facher Menge konzentrierter Salzsäure am Rückflusskühler 20 Stunden lang gekocht. Das Hydrolysat wurde mit Tierkohle eine halbe Stunde im Wasserbad erwärmt, filtriert und mit warmem Wasser ausgewaschen. Das gesamte Filtrat wurde auf 100 ccm gebracht.

Um das Cystin in Cystein zu reduzieren, wurde die Flüssigkeit mit 0,5 g Zinkstaub versetzt und bei Zimmertemperatur (21,5°C) 30 Minuten lang stehen gelassen. Nach Bestimmung des Säuregehaltes wurde die Flüssigkeit mit der berechneten Menge 20%iger Natronlauge versetzt, bis der Gehalt genau 2% HCl betrug, dann mit genau 2% HCl auf 250 ccm gebracht. Mit 20 ccm von den 250 ccm 2% HCl-haltiger Flüssigkeit wurde das Cystin nach dem jodmetrischen Verfahren von Y. Okuda (1925) ermittelt.

Die Versuchsergebnisse waren folgende:

TABELLE V.

Bebrütungs- dauer in Tagen	Tryptophan %	Tyrosin %	Cystin samt Cystein %
Frisch	1,29	3,70	0,93
14	1,37	3,38	0,90
30	1,28	3,59	0,90

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Das Vitellin des Meerschildkröteneies gehört im Stadium hoher Entwicklung zu den Nährstoffen des Embryos.

2. Das Vitellin verhält sich während der Bebrütung in seiner Zusammensetzung sehr wahrscheinlich ganz gleichmässig.

LITERATUR.

Fürth, O. (1920): Biochem. Zs., **109**, 103.

Fürth, O. u. Fleischmann (1922): Biochem. Zs., **127**, 143.

Kossel, A. u. Kutscher (1900–1901): Zs. f. physiolog. Chem., **31**, 165.

Okuda, Y. (1925): Jl. of Biochem., **5**, 217.

ON THE METHOD OF PREVENTING COAGULATION OF THE BLOOD WITHOUT ANY CHANGE IN ITS CORPUSCULAR VOLUME.

(Studies on the corpuscular volume of the blood. I)

By

MAGOJI HIRAKI.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial
University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)

(Received for publication, January 19, 1932)

In order to prevent the blood *in vitro* from coagulating, the usual method is to add some amount of ovalate, citrate or fluoride to it. The nature of their action is generally believed to be to the elimination of Ca-ions out of plasma, while Stuber and Sano maintained that this is due to the formation of the strongly ionizable complex compound of the fibrinogen with the oxalate or the citrate.

Whatever the mechanism of the preventing action may be, it is obvious that the addition of such a salt to the blood may disturb the equilibrium between the plasma and the corpuscles. We have learned through experience that the percentage volume of the corpuscular portion in the blood varies with the concentration of the salt added. In some particular cases, such as the determination of the total amount of the circulating blood, it is necessary to withdraw the blood, keeping its corpuscular volume unchanged. The present research was attempted to meet this practical need.

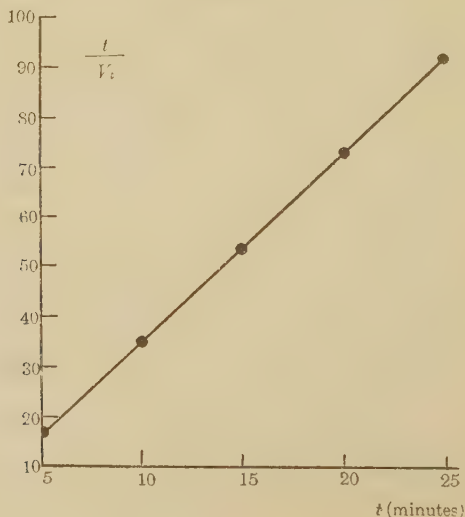
METHODS.

The general procedure of our experiments is to add the salt in question to a certain quantity of horse blood, and after one hour, to measure its volume and compare the result with that of the same blood without the addition of the salt.

The salts examined are K- and Na-oxalate, Na-citrate, and a mixture of K-oxalate and K-fluoride in a proportion of 4:1. All these salts are Kahlbaum's pure preparations. The corpuscular

volume of the blood was estimated by means of Hirota's centrifuge method. On applying the usual haematocrit method, the intercorpuscular space, which can not be abolished by ordinary centrifugal force, is inevitably included in the corpuscular volume. Hirota found in our Institute that, if a blood sample is centrifuged at a constant speed for t minutes and its corpuscular volume, V_t , is read, an empirical equation, $t/V_t = a + bt$, holds for any readings taken during the course of centrifuging. a and b are each a constant, and the reciprocal of b represents the constructive reading, V_∞ , after an indefinitely long period of centrifuging. Thus, if the centrifugal force is strong enough to overcome the resistance of the corpuscular form, $1/b$ is the net volume of the corpuscular sediment, which is independent of the centrifugal force applied. The value of $1/b$ is easily obtainable by plotting the value of t/V_t of several readings taken against the corresponding time, t , of centrifuging. As far as the above equation is applicable, the plotting gives a straight line, the cotangent of which gives the value of $1/b$. A more accurate result can be obtained by means of the method of least squares, though the graphic method was adopted in this research. Fig. 1 will suffice to show how this

Fig. 1.



equation holds and it gives a good straight line. That the applied centrifugal force is sufficiently strong, is ascertained by estimating the same sample with different revolution speeds. Above a certain limit the speed is found to be independent of the result, which is taken as the net value. Hirota showed that a speed of 2000 revolutions per minute is critical for the horse blood with our centrifuge of ordinary size (radius of 13 cm to the bottom of the tube). We confirmed this in our experiments, but, for convenience' sake, we preferred a speed of 3000 revolutions per minute constantly throughout the experiments.

EXPERIMENTS.

First, to defibrinated blood was added K-oxalate, or Na-oxalate or a mixture of K-oxalate and K-fluoride (4:1), each in a final concentration of 0.5%, and we found that the corpuscular volume was reduced in all cases (Table I).

TABLE I.

Salt added	Corpuscular volume
no salt	26.2 %
0.5 % K-oxalate	23.2 %
„ Na-oxalate	22.7 %
„ K-oxalate + KF (4:1)	24.3 %

Next, each of these salts was mixed with the blood in the same percentage (0.5%), as soon as it was drawn out of the animal, and the corpuscular volume was determined, defibrinated blood drawn at the same time being taken as the control. The result was the same as in the above example. In this case the reduction of the corpuscular volume is the least with the mixture of K-oxalate and KF in a proportion of 4:1, but in all cases with this mixture, a slight haemolysis took place, so that we discarded it for further experiments.

In order to elucidate the cause of the reduction of the corpuscular volume, the freezing-point depression, Δ , of the plasma

separated from each sample of this experiment was measured, and it was found that, in all cases, the freezing-point depression was increased by the addition of the salt. Results are given in Table II.

TABLE II.

Sample	Corpuscular volume		Δ of the plasma	
	%	reduction	Δ	increase
defibrinated blood	26.9		-0.560°C	
blood + 0.5% K-oxalate	23.9	3.0 (11.2%)	-0.697°	0.137° (24.5%)
„ + „ Na-oxalate	23.6	3.3 (12.2%)	-0.784°	0.224° (40.0%)
„ + „ Na-citrate	24.5	2.4 (8.9%)	-0.655°	0.095° (17.0%)
„ + „ (K-oxalate + KF)	25.0	1.9 (7.1%)	-0.742°	0.182° (32.5%)

Here we see that, except with the mixture of K-oxalate and KF, the reduction of the corpuscular volume is of the same order as that of the freezing-point depression, but not strictly proportional.

Now, the isotonic concentrations of these salts were investigated. The freezing-point depressions of the solutions of each salt in different concentrations are given in Table III. By means of interpolations from these data, the isotonic concentrations, which give $\Delta = -0.560^\circ$, were found to be 2.08% for K-oxalate, 1.52% for Na-oxalate and 3.34% for Na-citrate.

TABLE III.

Conc.	Freezing point depression of		
	K-oxalate	Na-oxalate	Na-citrate
1.0%	-0.296°C	-0.390°C	-0.210°C
1.5	—	-0.553	—
2.0	-0.544	-0.712	-0.380
3.0	-0.779	—	-0.509
4.0	-1.030	—	-0.660
5.0	-1.268	—	-0.781

Then each of these isotonic salt solutions was added to a defibrinated blood in the proportion of 1:9, and the corpuscular volume was examined, and it was found that the addition of these isotonic solutions slightly increased the volume (See Table IV). These results are reasonable, as a part of the ions was thought to be eliminated from the plasma medium.

TABLE IV.

Sample	Corpuscular volume
defibrinated blood	29.20 %
added with K-oxalate (2.08%)	29.24 %
„ „ Na-oxalate (1.52%)	29.42 %
„ „ Na-citrate (3.34%)	29.26 %

Next, the same concentration which caused no change in the corpuscular volume was searched for K-oxalate and Na-citrate, both being the materials most usually employed. A series of solutions of these salts in different concentrations were prepared and each of them was mixed with each sample of the same defibrinated blood in a volume proportion of 1:9, and their corpuscular volumes were compared with that of the original blood, the effect of dilution being of course taken into account. Owing to the circumstances of the experiment, 2-4 sets of determinations were carried out with one and the same blood sample. Results are given in Tables V and VI. Here we see that the 2.3% K-oxalate solution and 3.6% Na-citrate solution are those which cause no change in the corpuscular volume of the blood, whose freezing-point depression is -0.560°C , when they are mixed with the blood in the proportion of 1:9.

If another and especially a larger amount of these solutions is added, the corpuscular volume does not remain unchanged, but it decreases with the increasing amount of the solution. This is shown by Table VII. Thus the above-mentioned solutions should always be added in the proportion of 1:9 to the blood.

TABLE V.

defibrinated blood 0.9 cc. + K-oxalate sol. 0.1 cc.			
% of K-oxalate		% corpuscular volume	
with the same blood	3.0	23.39	(mean of 4 determ.)
	2.6	23.70	(" 3 ")
	Control	24.13	(" 3 ")
	2.2	24.30	(" 3 ")
do	2.3	24.39±0.03	(" 6 ")
	Control	24.43±0.03	(" 4 ")
	2.2	24.50±0.04	(" 6 ")
do	2.3	25.38±0.07	(" 8 ")
	Control	25.52±0.05	(" 8 ")

TABLE VI.

defibrinated blood 0.9 cc. + Na-citrate solution 0.1 cc.			
% of Na-citrate		% corpuscular volume	
with the same blood	4.0	26.25±0.07	(mean of 6 determ.)
	Control	26.60±0.08	(" 4 ")
	3.4	27.00±0.11	(" 6 ")
	3.8	25.60±0.04	(" 6 ")
do	Control	26.12±0.06	(" 4 ")
	3.6	26.09±0.07	(" 6 ")

TABLE VII.

defibrinated blood +3.6% Na-citrate solution.			
cc. citrate sol.	cc. defibr. blood	Proportion	Corpuscular volume (mean of 3 determ.)
0	Control	—	28.70 %
0.05	0.45	1:9	28.64 %
0.20	0.20	1:1	27.44 %
0.80	0.20	4:1	26.79 %
1.80	0.20	9:1	25.73 ±

At the last, the limiting concentration of these salts, which is just sufficient to prevent coagulation, was studied. Salt solutions of different concentrations, mixed with blood shed in a paraffinized vessel, were all in the proportion of 1:9. After one hour, the mixtures were filtered through a piece of silk and it was observed whether any coagula had been produced. We found that the limiting concentration was 0.8% for K-oxalate, and 3.2% for Na-citrate. Refer to Table VIII.

TABLE VIII.

shed blood + the salt solution in 9:1 (- no coagulation occurs, + coagulation is performed within 1 hour)										
Salt in %	4.0	3.8	3.6	3.4	3.2	3.0	1.0	0.8	0.6	0.4
K-oxalate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Na-oxalate	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Thus we see that the 2.3% solution of K-oxalate is far above its limiting concentration, while the 3.6% solution of Na-citrate is only slightly above its limiting concentration which is just sufficient to prevent coagulation.

CONCLUSIONS.

The 2.3% K-oxalate solution or 3.6% Na-citrate solution causes no change in the corpuscular volume of blood of which $\Delta = -0.560^{\circ}\text{C}$ when the solution is added to the blood in the proportion of 1:9. The limiting concentration just preventing the coagulation of the same blood when used in the same proportion is 0.8% for K-oxalate, and 3.2% for Na-citrate.

REFERENCES.

- Hirota (1926, 27): J. of Biophysics., 1, 233; do. 2, 283.
 Stuber u. Sano (1923): Biochem. Zs., 134, 260.

A NOTE ON THE HAEMATOCRIT METHOD MODIFIED BY SAHLI

(Studies on the corpuscular volume of the blood. II)

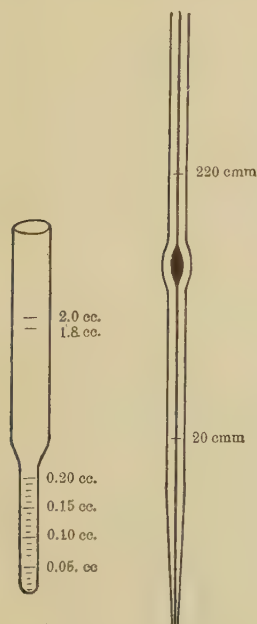
By

MAGOJI HIRAKI.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)

(Received for publication, January 19, 1932)

Sahli reported a modified haematocrit method. His apparatus consisted of a haematocrit tube and a capillary pipette sketched in the figure below. The procedure of estimation is as follows:—The tube is filled with a 0.9% NaCl solution up to the mark of 1.8 cc. In the pipette, a 5% solution of ammonium oxalate is drawn



up to the mark of 20 cmm, and then the blood is drawn further into it till it is filled to the mark of 220 cmm. Now the content of the pipette is poured into the tube, and after being well mixed, it is centrifuged until a constant volume is attained. Sahli thought it sufficient to do so for 30 minutes with an ordinary centrifuge. By diluting the blood to ten-fold of its original volume with the 0.9% NaCl solution, he was enabled to prevent agglutination, which would make the centrifugal sedimentation incomplete; and also to abolish the osmotic effect of the added oxalate solution. Moreover he thought that, by this dilution he could avoid the influence of the variety of the osmotic pressure existing between individual blood samples. He asserted, too, that, if a very narrow tube is used, friction

and its capillary resistance will hinder complete sedimentation on centrifuging.

Considered theoretically, the dilution of the blood with the NaCl-solution is not correct. What we want to measure is the net corpuscular volume of the blood as it is, and not the volume which is equilibrated with such an artificial condition as the 0.9% NaCl solution. The solution may certainly affect the corpuscular volume. If the effect be so small as to lie within the limit of experimental accuracy, the dilution may be convenient in some cases. This, however, should be confirmed by experiments.

The influence of agglutination as well as of the capillary resistance will be effective for the result obtained by ordinary centrifuging. If we adopt Hirota's method, which gives the net corpuscular volume excluding the intercellular spaces, these factors will have no effect on the result. Thus we attempted here to examine Sahli's modification by applying Hirota's method to it. As to the details of Hirota's method, our previous paper on this subject should be consulted.

The capillary part of the centrifuge tube used by us is somewhat narrower than Sahli's original one. The latter has a diameter of about 2.9 mm. (calculated from his sketch in its original size), and a content of 0.20 cc. Ours is of 1.85 mm bore, and 0.10 cc. content, and it is graduated to 1/100 of it. The meniscus was read aided by the horizontal microscope for the Ostwald capillary electrometer.

1. EFFECT OF THE NaCl-SOLUTION.

A defibrinated blood sample was prepared from the blood of the horse kept in our Institute. The freezing point depression of it was 0.560°C . Each of these mixtures was treated by Hirota's method. A control test was carried out with the undiluted sample. Results are given in Table I. Here we see that the critical concentration of the NaCl-solution which causes neither swelling nor retraction of the corpuscles of our horse blood is 0.87%. In these experiments, the critical revolution speed of our centrifuge for these samples was tested, and it was found that 3000 revolutions per minute is sufficient to abolish the intercorpuscular spaces completely, so that this speed was adopted throughout this research.

TABLE I.
defibrinated blood + NaCl-solution (9:1)

conc. of NaCl.		corpuscular volume.	
with the same sample	{ 1.50%	24.83%	(mean of 4 determ.)
	{ 1.20 "	25.43	"
	{ 1.00 "	25.98	"
	{ control	26.46	"
"	{ 0.95 "	26.58	(mean of 3 determ.)
	{ 0.90 "	27.28	"
	{ control	28.06	"
	{ 0.85 "	28.40	"
"	{ 0.90 "	26.24	(mean of 4 determ.)
	{ control	26.54	"
	{ 0.85 "	26.71	"
	{ 0.80 "	26.79	"
"	{ 0.90 "	25.50	(mean of 9 determ.)
	{ control	26.58	(" 4 ")
"	{ 0.90 "	26.73	(" 3 ")
	{ control	27.27	"
	{ 0.85 "	27.92	"
"	{ 0.87 "	25.46 \pm 0.10	(mean of 6 determ.)
	{ control	25.39 \pm 0.05	"

2. IS DILUTION OF THE BLOOD WITH THE NaCl-SOLUTION
NECESSARY?

A NaCl-solution of different concentrations (0.8–1.5%) was added to a series of this blood-sample, in a proportion of a 9 parts salt solution to 1 part blood.

The original method is rather inconvenient in mixing the blood and coagulation preventing-agent in the pipette. To much blood is often drawn up, and then the suction has to be commenced again. If we measure 0.2 cc. of the blood alone in the pipette, and add it to the salt solution containing the coagulation-preventing-agent in the tube, as we do with Sahli's hemoglobino-meter, the procedure will become far easier. In our previous paper it was

reported that the 3.6% Na-citrate solution has no influence on the corpuscular volume of our blood sample, when 1:9 of it is added to the sample. Applying this fact to the present experiment, we prepared a solution mixture of the 0.87% NaCl-solution and the 3.6% citrate solution in the proportions of 9:1, and proved first with the defibrinated blood that this mixture is indifferent to the corpuscular volume of our blood sample, when 0.2 cc. of the latter is added to 1.8 cc. of the former (cf. Table II).

TABLE II.

Sample		Corpuscular volume in %
defibrinated blood alone	0.2 cc.	24.76 \pm 0.13 (mean of 6 determ.)
defibrinated blood	0.2 cc.	
0.87% NaCl	9	
3.6% Na-citrate	1	
		24.59 \pm 0.13 (mean of 6 determ.)

Then the original procedure of Sahli was compared with our modification of adding the 0.2 cc. of the blood (not defibrinated) to 1.8 cc. of our solution mixture of NaCl and Na-citrate, using the same blood sample. A satisfactory coincidence of the results of these two procedures was observed (cf. Table III). Also we found as expected that our modified procedure was much more convenient than the original procedure.

TABLE III.

	Corpuscular volume in %
Sahli's original procedure	25.04 \pm 0.12 (mean of 5 determ.)
Our modified procedure	25.08 \pm 0.04 (mean of 5 determ.)

It seems to us unnecessary to dilute the blood with the isotonic NaCl-solution, if we measure the corpuscular volume by Hirota's method, as described above. To examine this, first 0.2 cc. of the blood was added to 0.02 cc. of the 3.6% Na-citrate solution alone in Sahli's pipette, and its corpuscular volume was compared with

that obtained by our modified procedure of diluting the blood with the solution mixture of NaCl and Na-citrate. The agreement was again satisfactory (cf. Table IV). Thus it was verified that the

TABLE IV.

Sample		Corpuse. volume in %
blood	0.20 cc. }	26.51 \pm 0.08 (mean of 6 determ.)
3.6% Na-citrate sol.	0.02 cc. }	
blood	0.20 cc. }	26.62 \pm 0.04 (mean of 6 determ.)
NaCl+Na-citrate sol	1.80 cc. }	

dilution of the sample to 10-times with the isotonic salt solution is quite superfluous. The only advantage of the latter is to avoid the trouble of intermixing the blood and the citrate solution in the pipette. Concerning this, however, so large a quantity as ten times the solution mixture is not necessary. Any amount will do so long as it contains a sufficient quantity of the citrate to prevent coagulation. To test this supposition, 0.20 cc. of the blood were added to various amounts of the solution mixture of from 0.2 cc. to 1.8 cc. With 0.1 cc. of the latter it was found that coagulation took place after several tens of minutes as the quantity of the citrate was insufficient. With more than 0.2 cc. of it, prevention of coagulation was complete, and the measured corpuscular volume was observed to be independent of the amount of the solution. (cf. Table V).

TABLE V.

Salts solution. (0.87% NaCl 9 } 3.6% Na-citrate 1)	Corpuscular volume in %	Deviation from the mean of all determinations
0.2	25.91 (mean of 2 determ.)	-0.02
0.4	25.87 "	-0.06
0.8	25.98 "	+0.05
1.0	25.71 "	-0.22
1.8	26.18 "	+0.25
	25.93 (mean)	

SUMMARY.

The procedure of Sahli's haematocrit method is modified as follows:—A mixture of the NaCl-solution which is indifferent to the corpuscular volume (e.g. 0.87% for a horse blood of which $\Delta=0.560^{\circ}\text{C}$), and 3.6% Na-citrate solution in the ratio of 9:1 is prepared. Any appropriate amount of more than 0.2 cc. of it is poured in the haematocrit tube, and then 0.20 cc. of the blood measured exactly with a suitable capillary pipette, is added into it and mixed thoroughly. The tube is centrifuged at a constant speed of revolution (3000 revs. per minute or more with an ordinary centrifuge of 13 cm. radius) at intervals, the corpuscular volume is read. Vt being this volume after t minutes of centrifuging, t/Vt is calculated for each reading and is plotted on the ordinate against t on the abscissa. A straight line is thus obtained, the cotangent of which is the net corpuscular volume of the blood, excluding its intercorpuscular spaces.

REFERENCES.

- Hiraki (1932): This volume,
Hirota (1926, 27): J. of Biophysics., **1**, 233; do. **2**, 283.
Shali (1929): Schweiz. Med. Woch. 1929, 373.

THE ISOELECTRIC POINT OF GLYCOCOLL AND α -ALANINE.

By

MAGOJI HIRAKI.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. Dr. E. Shoji.)

(Received for publication, January 19, 1932)

INTRODUCTION

The isoelectric point of an amphoteric electrolyte can be calculated by the theoretical equation,

$$I = \sqrt{\frac{Ka}{Kb} Kw} \quad \text{in } [H^+] \text{ unit}$$

or $pH = pKw + pKa - pKb$ in the pH unit, Ka or Kb is the dissociation constant of the material as an acid or a base respectively, and $pKa = -\log Ka$, $pKb = -\log Kb$ and $pKw = -\log Kw$, where Kw is the ionic product of the water. Michaelis (1911, 1912) applied this equation to several amino acids, adopting the data of Ka and Kb already reported by Winkelblech, Kanitz, etc., e.g. he obtained pH 4.48(25°) for phenylalanine and pH 6.09(25°) for glycocoll. Naturally the possibility of this calculation is limited by the condition that the necessary data of Ka and Kb at the desired temperature are known, and its reliability depends upon the accuracy of the data adopted. Thus direct measurement of the isoelectric point is sometimes necessary.

The direct determinations of the isoelectric point of amino-acids hitherto reported are rather scarce. Michaelis and Davidsohn determined the point for poorly soluble amino-acids (m- and p-aminobenzoic acid) by estimating the pH of the solubility minimum, under the reasoning that the latter corresponds to the former, and verified that the theoretical data calculated by the above-mentioned equation lies in the scope of the observed data. To easily soluble materials, Michaelis applied another method which consisted of

the following procedure: a series of weakly buffered solution of gradually differing pH are prepared, and a certain amount of the substance in question is added in each of them. If its pH is decreased numerically by the addition, the substance acts as an acid; if the reverse is the case, it acts as a base. Between these two groups of the pH ranges there should exist a certain pH at which the addition of the substance causes no variation; this is the isoelectric point of the substance wanted. By means of this method he found that the isoelectric point of phenylalanine lay near pH 4.58 (18°–19°), and that of glycocoll between pH 5.80 and 6.29 (25°). These figures agree satisfactorily with the calculated data mentioned above. Bach applied the same method to asparagine and also to glycocoll, and obtained pH 4.3 for the former, and pH 5.8 for the latter, at 18°–20°C.

There is another method of estimating the isoelectric point of a soluble ampholyte directly. First, a standard acid solution e. g. the HCl solution of a known normality, is titrated with a standard alkali solution, and its titration curve, i. e. the course of its pH deviating with the addition of the alkali, is traced. Then the same acid solutions, in which different amounts of the substance in question are dissolved, are studied in the same way. All titration curves thus studied are plotted on a diagram, the amount of alkali on the abscissa and the pH on the ordinate. The slope of the curve depends upon the buffering power of the solution, i. e. the concentration of the amphoteric substance dissolved in it. The more concentrated, the slower the slope. That of the curve for the pure acid solution is practically perpendicular between pH 4 and 10. If, however, the isoelectric point of the substance lies within this range, all titration curves thus studied intersect with one another at one and the same point which lies on the perpendicular part of the curve for the pure acid solution. The pH corresponding to this point is the isoelectric point of the substance studied. This method was first applied by Shukov and Shchukarev to gelatine. Mori, of our Institute, invented this method, quite ignorant of their research, and applied it to albumin, albumose and peptone, and Inoue did the same to the amphoteric contents of gastric juice.

They adopted the quinhydrone method of estimating the pH titrimetrically and achieved excellent success. This method seems to us more accurate than any other method. Our present study is to apply this method to some amino acids, the calculation of the pH of which by the above mentioned formula is possible, and to test whether the observed and calculated data agree with each other or not.

EXPERIMENTS.

1. Is the quinhydrone method applicable to a solution containing amino acids?

Our first step in the experiment is to examine whether the titration curve of a HCl solution containing the amino acid can be studied by the quinhydrone method. It is obvious that the quinhydrone method is not applicable when the solution contains some agents other than the H^+ ion which disturbs the equilibrium between quinone and hydroquinone, or alters the concentration of one of these two components. It is said that protein combines with quinone and disturbs the equilibrium, but, the velocity of this reaction being relatively slow, the quinhydrone method is believed to be applicable if it be carried out within a few minutes. We had to examine whether this was the case with amino acids.

Solutions of glycocoll "Kahlbaum" and also α -alanine "Kahlbaum" were prepared, each in 5%, 10% and 15% strengths. Each 2.0 cc. of these solutions was mixed with 2.0 cc. of 0.05N HCl-solution and then a different amount (0-6.0 cc.) of 0.02N NaOH-solution was added to it. The pH of this solution was measured by the usual hydrogen gas electrode method on the one hand, and by the quinhydrone method on the other.

For the electrode vessel in both cases we found one of the injection syringe type very convenient. This vessel was first used in our Institute by Dr. Kurose and is made of a 1 cc. injection syringe, of which the top of the hollow plunger bears a platinum wire electrode sealed. The figure will suffice to show its construction. To compose a quinhydrone electrode, the electrode



had better be gilded, though this is not absolutely necessary. An amount of the quinhydrone powder is put in the syringe and the solution is drawn up into it, and the plunger is fixed in its position by means of a suitable metal clip; it is then well shaken, and the determination is carried out. A small bubble of air facilitates the intermixing of the solution with quinhydrone on shaking. In the present case, the measurement of the potential was repeated at each 1, 5, 10 and 15 minutes, or longer, after the solution had been saturated with quinhydrone.

For the purpose of the hydrogen gas electrode, the platinum electrode is coated with platinum black and is polarized with hydrogen as usual. The solution is drawn up in the syringe, and then hydrogen gas of about $\frac{1}{3}$ volume of the solution is also drawn in, and it is thoroughly shaken in a water bath at the experimental temperature, the tip of the syringe being sealed with a rubber cap. Care should be taken that the rubber is not alkaline, which is sometimes the case, especially with red rubber. The capillary space between the syringe and its plunger is sealed with vaseline, and the plunger is fixed in its position with a clip. After being shaken for 10 minutes or so, the tip-cover is taken off and the tip is brought into a saturated KCl-solution which serves as the junction liquid between the gas electrode and the calomel one. Subsequently the determination is repeated at intervals of 5 minutes or so, until the potential becomes stationary.

In both determinations 0.1N KCl-calomel electrode was used as the half cell, which was standardized with a 0.01N HCl solution, according to the suggestion of Katsu, who studied it in our Institute. The other arrangements of the potentiometry were also just the same as were described in his article and need not be repeated here.

Six series of experiments were carried out with glycocoll, and 5 with α -alanine. The results obtained are summarized as follows.

Experiments with glycocoll: The potential of the quinhydrone electrode varies gradually with the lapse of time. At a range of pH between 4 and 5, the variation is very small and irregular,

sometimes unaccountably increasing, and again in another case, similarly decreasing. Below (more acidic than) this range, the potential deviates with time towards increasing the pH value calculated from it, i. e. decreasing the acidity, and above (less acidic than) this range, it deviates with time towards decreasing the calculated pH value, i. e. increasing acidity. Against belief in case of the protein solution, the initial potential (that of 1 minute after saturation with quinhydrone in our case) does not give the real pH, but sometimes too high, and sometimes too low a value. Above pH 6 or so, the initial potential reckoned to the pH volume is always very low (more acidic) and often 1.0 or more in the pH unit, and moreover it deviates further towards greater acidity with time. Table I and Graph 1 given here will serve as example. In the graph, the null line represents the level of the pH estimated by the H_2 -gas electrode method. Deviation above this line means that the quinhydrone pH is too high (less acidic), and that below it means that the quinhydrone pH is too low.

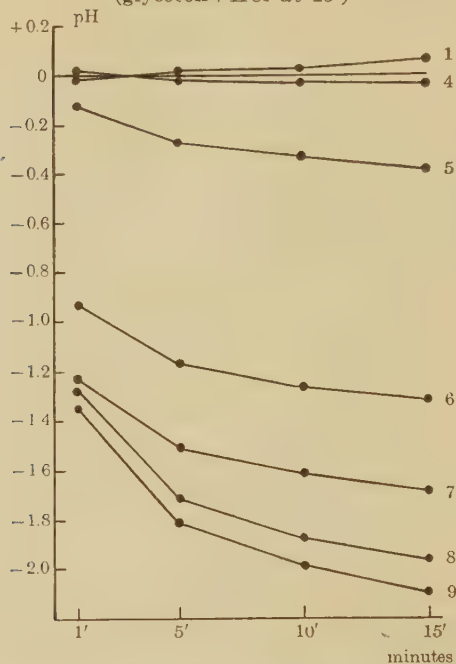
TABLE I.
10% glycocoll 2.0 cc. + 0.05N HCl 2.0 cc. (25°C).

No.	0.02N NaOH added (cc.)	real pH (H_2 -gas electrodes)	pH by quinhydrone method				deviation of quinhydrone pH from real pH			
			1'	5'	10'	15'	1'	5'	10'	15'
1	0.0	3.824	3.816	3.829	3.853	3.890	-0.008	+0.005	+0.029	+0.066
2	2.0	4.044	4.059	4.073	4.093	4.112	+0.015	+0.029	+0.049	+0.068
3	4.0	4.616	4.621	4.621	4.650	4.665	+0.005	+0.005	+0.035	+0.049
4	4.5	4.981	5.000	4.976	4.965	4.954	+0.019	-0.005	-0.016	-0.027
5	4.7	5.415	5.272	5.149	5.083	5.039	-0.133	-0.266	-0.332	-0.376
6	4.9	6.396	5.464	5.230	5.135	5.075	-0.932	-1.166	-1.261	-1.321
7	5.1	6.814	5.588	5.306	5.200	5.129	-1.226	-1.508	-1.614	-1.685
8	5.5	7.294	6.027	5.582	5.421	5.328	-1.267	-1.712	-1.873	-1.966
9	6.0	7.569	6.215	5.761	5.584	5.472	-1.354	-1.808	-1.985	-2.097

+ means that the quinhydrone pH is numerically larger and

- means numerically smaller than the real pH.

Graph 1. Deviation of quinhydrone pH from real pH
(glycocoll + HCl at 25°)



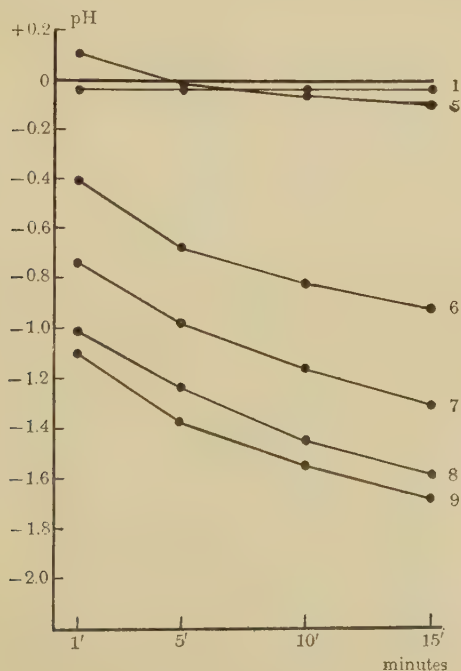
Experiments with α -alanine: Between pH 3 and 4 or sometimes 4.5, the potential is almost stationary and gives a pH slightly more acidic in most cases. Above this range, the potential varies with time to decrease the pH value, i. e., to increase the acidity. The initial potential never gives a correct pH, but sometimes the potential after several minutes, yes, even after 15 minutes, gives the correct one, when the real pH lies between about 4 and 5 or so. Above this, the initial deviation is marked and always towards the acidic side, and moreover it proceeds further with time. Table II and Graph 2 are given as examples.

In order to discuss why the quinhydrone method gives such erroneous results, our experiments are insufficient, but we can undoubtedly assert from them that the quinhydrone method is not applicable to estimate the pH of a solution containing these amino acids.

TABLE II.
10% α -alanine 2.0 cc. + 0.05N HCl 2.0 cc. (18°C).

No.	0.02N NaOH added (cc.)	real pH (H ₂ -gas electrode)	pH by quinhydrone method				deviation of quinhydrone pH from real pH			
			1'	5'	10'	15'	1'	5'	10'	15'
1	0.0	3.733	3.692	3.692	3.693	3.693	-0.041	-0.041	-0.040	-0.040
2	2.0	3.945	3.943	3.943	2.943	3.943	-0.002	-0.002	-0.002	-0.002
3	4.0	4.536	4.544	4.534	4.530	4.529	+0.008	-0.002	-0.006	-0.007
4	4.5	4.927	4.955	4.939	4.932	4.926	+0.028	+0.012	+0.005	-0.001
5	4.7	5.383	5.482	5.371	5.324	5.284	+0.099	-0.012	-0.059	-0.099
6	4.9	6.541	6.132	5.861	5.721	5.615	-0.409	-0.680	-0.820	-0.926
7	5.1	7.102	6.362	6.113	5.929	0.794	-0.740	-0.989	-1.173	-1.308
8	5.5	7.596	6.575	6.353	6.142	6.010	-1.021	-1.243	-1.454	-1.586
9	6.0	7.905	6.804	6.532	6.355	6.220	1.101	-1.373	-1.550	-1.685

Graph 2. Deviation of quinhydrone pH from real pH.
(α -alanine + HCl at 18°)



2. *Estimations carried out by means of the H₂-gas electrode method.*

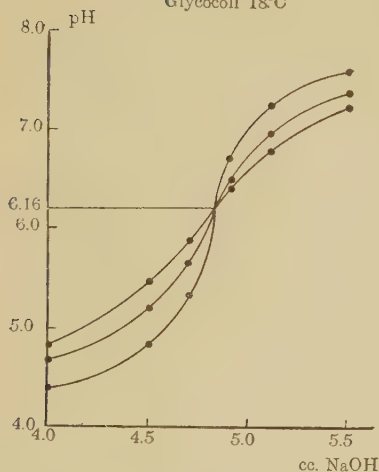
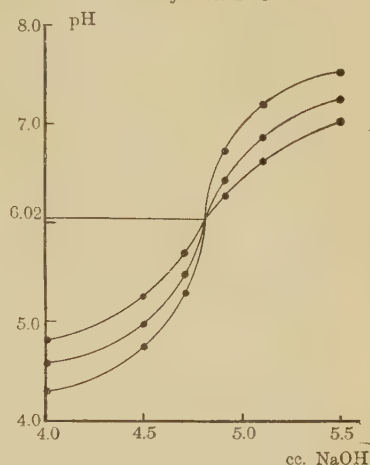
Each 2.0 cc. of a 5%, 10% or 15% solution of glycocoll as well as of α -alanine were mixed with 2.0 cc. of the 0.05N HCl solution, and then a different amount (0, 2.0, 4.0, 4.5, 4.7, 4.9, 5.1 and 6.0 cc.) of the 0.02N NaOH solution was added. The pH of each mixture was estimated at 18° and also at 25°, by means of the H₂-gas electrode method described above. Results are given in Tables III-VI. Plotting the pH value against the amount of the NaOH solution added, we had the titration curves given in Graphs 3-6.

TABLE III.
pH of the titration curves (18°C).

0.02N NaOH added (cc.)	5% glycocoll 0.05N HCl	2.0 cc. 2.0 cc.	10% glycocoll 0.05N HCl	2.0 cc. 2.0 cc.	15% glycocoll 0.05N HCl	2.0 cc. 2.0 cc.
0.0	3.515		3.839		4.050	
2.0	3.750		3.943		4.265	
4.0	4.352		4.650		4.808	
4.5	4.776		5.165		5.466	
4.7	5.253		5.494		5.813	
4.9	6.728		6.366		6.231	
5.1	7.036		6.981		6.709	
5.5	7.574		7.418		7.241	
6.0	7.856		7.700		7.536	

TABLE IV.
pH of the titration curves (25°C).

0.02N NaOH added (cc.)	5% glycocoll 0.05N HCl	2.0 cc. 2.0 cc.	10% glycocoll 0.05N HCl	2.0 cc. 2.0 cc.	15% glycocoll 0.05N HCl	2.0 cc. 2.0 cc.
0.0	3.504		3.824		4.032	
2.0	3.755		4.044		4.247	
4.0	4.323		4.616		4.775	
4.5	4.795		4.981		5.152	
4.7	5.257		5.415		5.582	
4.9	6.672		6.396		6.335	
5.1	7.075		6.814		6.538	
5.5	7.582		7.298		7.081	
6.0	7.860		7.569		7.377	

Graph 3.
Glycocoll 18°CGraph 4.
Glycocoll 25°C

On all of these graphs we discovered that the titration curves for the solutions containing different amounts of the amino acid intersected with one another at one and the same point, of which the corresponding pH value was read on the graphs. The isoelectric

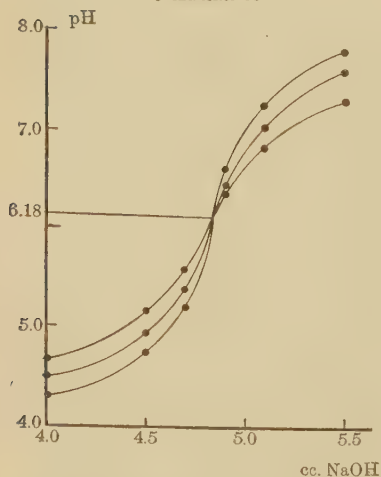
TABLE V.
pH of the titration curves (18°C).

0.02N NaOH added (cc.)	5% α -alanine 0.05N HCl	2.0 cc. 2.0 cc.	10% α -alanine 0.05N HCl	2.0 cc. 2.0 cc.	15% α -alanine 0.05N HCl	2.0 cc. 2.0 cc.
0.0	3.447		3.733		3.901	
2.0	3.685		3.945		4.118	
4.0	4.263		4.536		4.679	
4.5	4.721		4.927		5.101	
4.7	5.116		5.383		5.572	
4.9	6.589		6.541		6.435	
5.1	7.213		7.102		6.848	
5.5	7.804		7.596		7.343	
6.0	8.118		7.905		7.672	

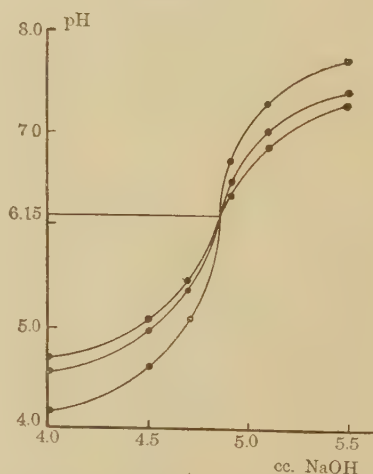
TABLE VI.
pH of the titration curves (25°C).

0.02N NaOH added (cc.)	5% α -alanine 2.0 cc. 0.05N HCl 2.0 cc.	10% α -alanine 2.0 cc. 0.05N HCl 2.0 cc.	15% α -alanine 2.0 cc. 0.05N HCl 2.0 cc.
0.0	3.350	3.672	3.915
2.0	3.607	3.922	4.129
4.0	4.191	4.565	4.695
4.5	4.638	5.042	5.102
4.7	5.064	5.421	5.486
4.9	6.726	6.479	6.349
5.1	7.149	6.865	6.758
5.5	7.663	7.352	7.254
6.0	7.963	7.677	7.540

Graph 5.
 α -Alanine 18°C



Graph 6.
 α -alanine 25°C



point of glycocoll and α -alanine determined by this method is tabulated as follows:

glycocoll: pH 6.16 at 18°, and pH 6.02 at 25°.

α -alanine: pH 6.18 at 18°, and pH 6.15 at 25°.

Now these data should be compared with those calculated from the dissociation constants. As to the dissociation constants, Ka and Kb , of the amino acids, there are two different sorts, of which the one is based on the classical view, the other on the "Zwitterion" hypothesis. The former view tells us that an amino acid at its isoelectric point exists in most parts as undissociated molecules, while, according to the latter view, it exists as "Zwitterion" or amphion (so named by Harned and Owen) which bears a positive charge on its amino group and a negative one on its carboxyl group at the same time. The dissociation constants based on these two views are numerically quite different, but they hold a relation with each other given by

$$Ka' = \frac{Kw}{Kb}, \quad \text{and} \quad Kb' = \frac{Kw}{Ka}$$

where Ka , Kb represents the dissociation constants based on the classical view, while, Ka' , Kb' , those on the "Zwitterion" hypothesis. Thus the isoelectric point given by the formulae, $\frac{1}{2}(pKa + pKw - pKb)$ and $\frac{1}{2}(pKa' + pKw - pKb')$ is identical.

The data of Ka and Kb adopted by Michaelis as well as by Bach mentioned above are those determined by Winkelblech, and Kanitz, both based on the classical view. Recently several determinations were reported by American investigators, most of them adopting the "Zwitterion" hypothesis. Here we will cite some of them converted to pKa and pKb or pKa' and pKb' , and calculate the isoelectric point from them, as given in Table VII. The agreement between them and our data determined directly is quite satisfactory.

SUMMARY.

The isoelectric point of glycocoll as well as of α -alanine was determined by detecting the intersection point of the titration curves of HCl solution containing different amounts of the mentioned amino acid, and the following data were obtained:—

glycocoll: pH 6.16 at 18°C, and pH 6.02 at 25°C.

α -alanine: pH 6.18 at 18°C, and pH 6.15 at 25°C.

TABLE VII.

t(°C)	<i>pKa</i>	<i>pKb</i>	pH(iso).	Authors.
glycocoll.				
18	9.98	11.77	6.23	Dernby
17.5	9.93	11.71	6.23	Michaelis and Rona
18	9.84	11.73	6.18	Hirsch
18	direct estimation		6.16	our data
25	9.47	11.57	5.95	Winkelblech
25	9.405	11.656	5.87	Branch and Miyamoto
25	*2.330	*4.140	6.09	Levene, Simms and Pfaltz
25	*2.308	*4.255	6.03	Harned and Owen
25	*2.290	*4.215	6.04	Mitchell and Greenstein†
25	direct estimation		6.02	our data
α-alanine.				
18	9.86	11.90	6.11	Hirsch
18	direct estimation		6.18	our data
25	9.05	11.29	5.88	Winkelblech
25	9.69	11.66	6.01	Branch and Miyamoto
25 (?)	*2.35	*4.28	6.03	Simms and Levene
25	direct estimation		6.15	our data

* denotes Ka' and Kb' . † mean of their titration data without salts. We took $pKw=13.998$ at 25°C after Lewis and Randall and 14.250 at 18°C calculated from the former.

These data agree well with those calculated from their dissociation constants.

On estimating the pH of a solution containing an amino acid, the quinhydrone electrode method does not give a correct result. Above pH 5 it gives a too highly acidic result, and the error grows startlingly large when the pH is above 6 or so.

REFERENCES.

- Bach (1916): Bull. Soc. Chim. Biol., **9**, 1233.
 Branch and Miyamoto (1930): J. Amer. Chem. Soc., **52**, 863.
 Dernby (1916): Cited in Michaelis (1922): Wasserstoffionenkonz. S. 61.
 Harned and Owen (1930): J. Amer. Chem. Soc., **52**, 5091.
 Hirsch (1924): Biochem. Zs., **147**, 433.

- Inoue (1930): Japan. J. Gastroenterol., 2, 1.
 Katsu (1927): J. Biophysics., 2, 95.
 Levene, Simms and Faltz (1924): J. Biol. Chem., 61, 459.
 Michaelis (1912): Biochem. Zs., 47, 250.
 Michaelis and Davidsohn (1911): Biochem. Zs., 30, 143.
 Michaelis and Rona (1913): Biochem. Zs., 49, 248.
 Mitchell and Greenstein (1930): J. Gen. Physiol., 14, 255.
 Mori (1927): J. Biochem., 7, 411.
 Shchukarev (1927): Biochem. Zs., 180, 177.
 Shukov and Shchukarev (1925): J. Physic. Chem., 29, 285.
 Simms and Levene: Cited in Simms (1928): J. Gen. Physiol., 11, 630.
 Winkelblech (1901): Cited in Landolt's Tabellen. (1923).

ÜBER DIE ZUCKERASSIMILATION DURCH GALLENSÄURE (II).

VON

HIDEO YUUKI.

*(Aus der gynäkologischen Klinik und dem physiologisch-chemischen Institut
der medizinischen Akademie zu Okayama. Ausgeführt unter der
Leitung von Prof. Dr. Shimizu.)*

(Eingegangen am 8. April 1932)

In der ersten Mitteilung (1932) habe ich schon berichtet, dass bei Kaninchen die Resorption des Traubenzuckers im Darm durch Zufuhr der Cholsäure gefördert, und die Fixierung der Traubenzuckers in der Leber durch Mitzufuhr dieser Säure gesteigert wird, was daraus hervorgeht, dass der hyperglykämische Quotient zwischen dem Pfortaderblute und dem Lebervenenblute bei Mitzufuhr von Cholsäure einen viel höheren Wert hat, als bei Zufuhr von Traubenzucker allein. Dieses Ergebnis hat mir gezeigt, dass die die Assimilation des Zuckers fördernde Wirkung der Cholsäure zum Teil auf der günstigen Resorption des Traubenzuckers bei Gegenwart von Gallensäure beruht.

Im hiesigen Institut hat Higashi (1931) beobachtet, dass die Gallensäure in der Galle aus der Gallenblasenfistel des Hundes durch Zufuhr von Ergosterin oder von mit Ultraviolettstrahlen bestrahltem Ergosterin, besonders von letzterem, vermehrt wird. Auf Grund dieser Tatsache hat er die Ansicht ausgesprochen, dass die Gallensäure wahrscheinlich aus den Sterinen der Ergosterinreihe gebildet wird, weil die Vermehrung der Gallensäure in der Fistelgalle am Tage nach der Ergosterinfütterung eintritt, und chemisch konstitutionell ein inniger Zusammenhang zwischen Gallensäure und Ergosterin besteht. Wenn die Gallensäure also von Sterin herkommen sollte, so muss die Wirkung des Ergosterins als solche der Gallensäure erfolgen, indem sich bei Zufuhr von Ergosterin die Gallensäurebildung in der Leber vermehrt. In diesem Sinne hat Chikamori (1932) beim Kaninchen beobachtet,

dass die alimentäre Glykosurie durch Zufuhr von Ergosterin oder durch die eines Pilzes (*Cortinellus Shiitake*), der Ergosterin enthält, herabgesetzt wird, und dass weiter bei dem Kaninchen, das einen Gallensäureverlust aus der Gallenblasenfistel erlitten hat, die durch diesen Verlust herabgesetzte Glykogenbildung durch Zufuhr von Ergosterin wieder zunimmt.

Neuerdings haben Chikamori (1932) und Fuzita (1931/32) gefunden, dass bei Kaninchen die Glykogenbildung der Leber durch Zufuhr von Phosphat bzw. sekundärem Phosphat oder von Phosphatgemisch von bestimmtem P_H gefördert wird. Daraufhin haben sie betont, dass für die Glykogenbildung aus Zucker eine adäquate Alkalität notwendig ist, wodurch der Zucker im Sinne von Isaac (1914) in eine reaktionsfähige Form verwandelt wird, und dass gleichzeitig das Phosphat durch die Wirkung der Phosphatase Hexosephosphorsäure bildet, die als Muttersubstanz der Glykogens betrachtet wird.

Nach der Angabe von Okamura (1928, 1930) wird die Nuclease der Darmwand durch die Wirkung der Gallensäure gefördert, indem die Phosphorsäure dadurch aus dem Nuclein der Nahrung bei der Verdauung frei gemacht wird. Diese Tatsache wurde neuerdings von Kuramoto (1932) bei der Verdauung der Nucleinsäure im Darm bestätigt.

Daher darf man wohl annehmen, dass bei der Verdauung im Darm durch die Wirkung der Gallensäure Phosphatpuffer entsteht, und dass diese Pufferwirkung irgendeinen Einfluss auf die Verdauung und Resorption der Nahrung auszuüben vermag.

In diesem Sinne habe ich den Einfluss des Sörensenschen Phosphatgemisches von $P_H=7,55$ und des Ergosterins auf die Resorption des Zuckers im Darm und auf die Zuckerassimilation in der Leber im Sinne der Gallensäurebildung aus Ergosterin erforscht.

Experimenteller Teil.

Zum Versuch wurden kräftige weibliche Kaninchen verwendet, die 4 Tage lang gehungert hatten. Operation, Blutentnahme und

Bestimmung des Blutzuckers bei den Versuchen wurden in genau derselben Weise ausgeführt, wie in der ersten Mitteilung angegeben.

Beim Resorptionsversuche wurden der einen Gruppe von Kaninchen zuerst als Kontrolle 5 ccm einer 10%igen Traubenzuckerlösung pro kg Körpergewicht, dann einer anderen Kaninchengruppe mit dem Zucker 10 ccm eines Sörensenschen Phosphatgemisches ($P_{II}=7,55$) pro kg Körpergewicht per os verabreicht. Auch beim Assimilationsversuche wurde dieselbe Menge von Zucker mit Phosphatgemisch einverleibt.

Die Versuche mit Ergosterin wurden in folgender Weise ausgeführt: Als Kontrolle wurden der ersten Gruppe von in Ruhe gehaltenen Kaninchen 10 ccm einer 50%igen Traubenzuckerlösung pro kg Körpergewicht per os verabreicht, und der zweiten Gruppe 12 Stunden vor Zufuhr des Zuckers 0,1 g Ergosterin pro Kaninchen peroral eingeführt. Diese zwei Kaninchengruppen wurden zum Assimilationsversuch verwendet, wobei der Blutzuckergehalt der Ohrvenen ohne Fesselung des Körpers vor und nach der Zuckerezufuhr ohne oder mit Ergosterin ermittelt wurde, um den Einfluss der Fesselung auf die Zuckerassimilation festzustellen, weil der andere Assimilationsversuch unter Fesselung des Körpers stattfand.

Beim anderen Assimilationsversuche mit Ergosterin wurde als Kontrolle zuerst eine Gruppe von Kaninchen mit 5 ccm einer 10%igen Traubenzuckerlösung gefüttert, und die andere Gruppe mit 0,1 g Ergosterin pro Kaninchen und hier weiter nach 12 oder 24 Stunden unter Laparotomie dieselbe Menge von Traubenzuckerlösung per os verabreicht, um den Einfluss des Ergosterins auf die Zuckerassimilation in der Leber zu ermitteln.

Das Verhältnis des Blutzuckergehaltes in der Vena hepatica zu dem in der Pfortader wird als hyperglykämischer Quotient (Q) bezeichnet, um so von dem Zuckerassimilationsgrad ein klares Bild zu gewinnen. Beim Resorptionsversuche wurde der prozentige Wert des Blutzuckergehaltes, der im Vergleiche mit dem vor der Zuckerezufuhr eine Vermehrung erfährt, als hyperglykämischer Prozentsatz (R) angegeben.

Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I–VIII zusammengefasst.

I. RESORPTION DES TRAUBENZUCKERS IM DARM BEI ZUFUHR VON PHOSPHATGEMISCH.

Bei diesem Versuch wurde der vom Darm resorbierte Zucker-gehalt im Pfortaderblute bei peroraler Zufuhr eines Phosphat-gemisches von $P_H=7,55$ stündlich untersucht. Als Kontrolle wurde der Zuckergehalt in der Pfortader bei Zufuhr von Zucker allein ermittelt. Um über den Resorptionsgrad leicht Aufschluss zu erhalten, wurde in allen Fällen der hyperglykämische Prozentsatz(R) angegeben.

Aus der Tabelle I und II erhellt, dass der durchschnittliche hyperglykämische Prozentsatz(R) im Verlauf der Zeit nach der Zuckerzufuhr allmählich zunahm und 41,6–82,5% betrug.

Der durchschnittliche hyperglykämische Prozentsatz bei Mit-zufuhr von Phosphatgemisch fiel im Vergleich mit dem der Kon-trolle im allgemeinen höher aus und betrug 55,6–83,1%. Er war am grössten 4 Stunden nach der Zuckerzufuhr. Verglichen mit dem der Kontrolle war er 1 Stunde nach der Zuckerzufuhr um 33,7%, 2 Stunden danach um 15,2% höher, 3 Stunden danach etwas niedriger und 4 Stunden danach fast wie der nach 3 Stunden.

Die Resorption des Traubenzuckers wird also durch Zufuhr von Phosphatgemisch im allgemeinen gefördert, und zwar 1 Stunde nach der Zuckerzufuhr am stärksten.

TABELLE I (Kontrolle)
Traubenzucker (10%).

Nr.	Körper-gewicht in Gramm	Prozent- gehalt des Blutzuckers vor der Fütterung	Blutzucker nach Stunden							
			1		2		3		4	
			%	R.	%	R.	%	R.	%	R.
1	1770	0,154	0,193	25,3	0,224	45,5	0,239	55,2	0,214	39,0
2	1900	0,105	0,194	84,8	0,213	102,9	0,247	135,2	0,246	134,3
3	2585	0,146	0,197	34,9	0,256	75,3	0,263	80,1	0,268	82,2
4	3235	0,155	0,213	37,4	0,258	66,5	0,275	77,4	0,288	85,8
5	2425	0,123	0,173	40,7	0,192	56,1	0,211	71,5	0,237	92,7
Durch-schnittswert		0,137	0,194	41,6	0,229	67,2	0,247	80,3	0,250	82,5

TABELLE II.
Traubenzucker (10%) und Phosphatgemisch.

Nr.	Körper- ge- wicht in Gramm	Prozent- gehalt an Blutzucker vor der Fütte- rung	Blutzucker nach Stunden							
			1		2		3		4	
			%	R.	%	R.	%	R.	%	R.
1	1670	0,138	0,180	30,4	0,216	53,5	0,233	68,8	0,229	65,9
2	1790	0,128	0,211	64,8	0,286	123,4	0,290	126,6	0,287	124,2
3	2130	0,108	0,157	45,4	0,182	68,5	0,184	70,4	0,140	29,6
4	2470	0,140	0,211	50,7	0,240	71,4	0,278	98,6	0,252	80,0
5	1710	0,108	0,204	88,9	0,175	62,0	0,122	13,0	gestorben	
Durchschnittswert		0,124	0,193	55,6	0,220	77,4	0,221	78,2	0,227	83,1
Vergleich mit der Kontrolle			33,7% höher		15,2% höher		2,6% niedriger		fast gleich	

II. ASSIMILATION DES TRAUBENZUCKERS IN DER LEBER BEI ZUFUHR VON PHOSPHATGEMISCH.

Bei diesem Versuch wurde der hyperglykämische Quotient(Q) sowohl bei Zufuhr von Traubenzucker allein als auch bei der von Zucker mit Phosphatgemisch ermittelt, indem der Blutzuckergehalt in der Vena hepatica sowie der in der Pfortader vor und nach der Zuckerzufuhr ohne oder mit Phosphatgemisch bestimmt wurde.

Es ist leicht begreiflich, dass der hyperglykämische Quotient abnimmt, wenn der Blutzucker der Pfortader in der Leber assimiliert wird.

Aus den Tabellen III–IV lässt sich ersehen, dass der durchschnittliche hyperglykämische Quotient sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Zuckerzufuhr mit Phosphatgemisch im Vergleich mit dem vor der Zuckerzufuhr ohne Ausnahme stets vermindert wurde.

Dies bedeutet, dass der eingeführte Zucker ohne oder mit Phosphatgemisch in der Leber assimiliert wird.

Dieser durchschnittliche Verminderungsgrad des hyperglykämischen Quotienten betrug bei Zufuhr von Zucker allein 6,03–12,1% und bei der von Zucker mit Phosphatgemisch 9,8–13,0%.

Also ist er bei Zufuhr von Zucker mit Phosphatgemisch viel höher als bei Zufuhr von Zucker allein, besonders 2 u. 4 Stunden nach der Zuckerzufuhr.

Daraus geht hervor, dass die Assimilation des Zuckers in der Leber durch Zufuhr von Phosphatgemisch ($P_H=7,55$) gefördert wird. Auch wurde damit völlig bewiesen, dass die Glykogenbildung in der Kaninchenleber (Fuzita, 1932) durch Zufuhr von Phosphatgemisch ($P_H=7,55$) zunimmt.

Traubenzucker (10%).

TABELLE III (Kontrolle)

Nr.	Körperge- wicht in Gramm		Zuckergehalt nach Stunden									
			Vor der Zucker- verabrei- chung		1		2		3		4	
			%	Q.	%	Q.	%	Q.	%	Q.	%	Q.
1	1900	P.	0,105	1,38	0,194	1,00	0,213	1,01	0,247	1,07	0,246	1,04
		H.	0,145		0,194		0,216		0,264		0,256	
2	1775	P.	0,154	1,07	0,193	1,09	0,224	1,03	0,239	1,05	0,214	1,10
		H.	0,165		0,211		0,230		0,252		0,236	
3	2585	P.	0,146	1,05	0,197	1,05	0,256	1,06	0,263	1,10	0,266	1,05
		H.	0,154		0,207		0,274		0,288		0,280	
4	3235	P.	0,155	1,17	0,213	1,03	0,258	1,10	0,275	1,10	0,288	1,14
		H.	0,181		0,219		0,284		0,302		0,327	
5	2425	P.	0,123	1,22	0,173	1,01	0,192	1,14	0,211	1,15	0,237	1,02
		H.	0,150		0,174		0,218		0,243		0,241	
Durchschnitts- wert		P.	0,137	1,16	0,198	1,02	0,229	1,07	0,247	1,09	0,250	1,07
		H.	0,159		0,201		0,244		0,270		0,268	
Durchschnittlicher Verminderungsgrad des Q.						12,1% nie- driger		7,8% nie- driger		6,03% nie- driger		7,8% nie- driger

TABELLE IV.
Traubenzucker (10%) und Phosphatgemisch.

Nr.	Körperge- wicht in Gramm		Zuckergehalt nach Stunden									
			Vor der Verabrei- chung des Zuckers u. P. G.		1		2		3		4	
			%	Q.	%	Q.	%	Q.	%	Q.	%	Q.
1	1670	P.	0,138	1,20	0,180	1,09	0,216	1,07	0,233	1,07	0,229	1,04
		H.	0,166		0,197		0,232		0,249		0,238	
2	1790	P.	0,128	1,23	0,211	1,13	0,286	1,11	0,290	1,13	0,287	1,07
		H.	0,157		0,238		0,317		0,328		0,306	
3	2130	P.	0,108	1,47	0,157	1,24	0,182	1,09	0,184	1,11	0,140	1,02
		H.	0,159		0,194		0,199		0,205		0,143	
4	2470	P.	0,140	1,19	0,211	1,10	0,240	1,07	0,278	1,08	0,252	1,16
		H.	0,166		0,232		0,256		0,301		0,292	
5	1710	P.	0,108	1,07	0,204	1,06	0,175	1,03	0,122	1,16	gestorben	
		H.	0,116		0,216		0,180		0,141			
Durch- schnitts- wert		P.	0,124	1,23	0,193	1,11	0,220	1,07	0,221	1,11	0,227	1,08
		H.	0,153		0,215		0,237		0,245		0,245	
Durchschnittlicher Verminderungsgrad des Q.						9,8% nie- driger		13,0% nie- driger		9,8% nie- driger		12,2% nie- driger

P.G. Phosphatgemisch.

III. ASSIMILATION DES TRAUBENZUCKERS IN DER LEBER BEI ZUFUHR VON ERGOSTERIN.

Hier wurde einem operierten Kaninchen 12 oder 24 Stunden nach der peroralen Zufuhr von Ergosterin eine Zuckerlösung mittelst Schlundsonde einverleibt, und vor u. nach der Zuckerzufuhr

stündlich der Blutzuckergehalt in der Vena hepatica und in der Pfortader bestimmt.

Der hyperglykämische Quotient ist in den Tabellen V und VI angegeben. Als Kontrolle wurde dem operierten Kaninchen nur die Zuckerlösung verabreicht. Hierbei wurde in der gleichen Weise wie früher der hyperglykämische Quotient ebenfalls ermittelt. Er findet sich in der Tabelle III.

Nach den Tabellen V und VI zeigte bei allen Fällen der durchschnittliche hyperglykämische Quotient im Vergleich mit dem vor der Zuckerzufuhr 12 sowie 24 Stunden nach der Ergosterinzufuhr Abnahme.

Diese Verminderung trat viel stärker 24 Stunden als 12 Stunden nach der Ergosterinzufuhr auf. Der Unterschied rührt wahrscheinlich daher, dass die durch Zufuhr von Ergosterin bedingte Zunahme der Gallensäurebildung in der Leber in einer bestimmten Zeit nach der Zufuhr des Ergosterins vor sich geht, und zwar besonders stark von 12 Stunden nach dieser Zufuhr ab.

Vergleicht man den Verminderungsgrad des durchschnittlichen hyperglykämischen Quotienten bei Zufuhr von Ergosterin mit dem der Kontrolle (Tabelle III), so findet man, dass er im allgemeinen, besonders aber bei dem Versuch 12 Stunden nach der Ergosterinzufuhr, niedriger ist. Beim Versuch 24 Stunden nach der Ergosterinzufuhr, war 1 und 4 Stunden nach der Zuckerzufuhr, war der Verminderungsgrad des Quotienten etwas höher als bei dem von 12 Stunden. Dieser im allgemeinen kleinere Verminderungsgrad des Quotienten beruht höchstwahrscheinlich auf der durch Fesselung des Kaninchenkörpers verursachten Mobilisation des Glykogens in der Leber, welches bereits durch die Zufuhr von Ergosterin gebildet worden war, da der alimentäre hyperglykämische Wert von in Ruhe gehaltenen Kaninchen durch 12 Stunden vorher stattgefundene Zufuhr von Ergosterin im Vergleich mit dem bei Zufuhr von Zucker allein viel kleiner gefunden wurde, was wohl daher rührt, dass der eingeführte Zucker bei Gegenwart von Ergosterin im Körper besser, und wahrscheinlich in der Leber, fixiert wird (Siehe Tabelle VII u. VIII).

Aus dem Ergebnis scheint hervorzugehen, dass die Assimilation

des Traubenzuckers durch vorherige Zufuhr von Ergosterin gefördert wird. Diese Förderung beruht wahrscheinlich auf der vermehrten Bildung von Gallensäure in der Leber, weil die gesteigerte Zuckerassimilation erst später, nach Zufuhr des Ergosterins, auftritt, wofür die Beobachtung Higashis spricht, nach der am Gallenblasenfistelhund durch Zufuhr von Ergosterin später die Gallensäure in der Blasengalle zunahm.

TABELLE V.

Ergosterin und Traubenzucker.

(Traubenzucker 12 St. nach Zufuhr des Ergosterins).

Nr.	Körpergewicht in Gramm		Zuckergehalt nach Stunden									
			vor		1		2		3		4	
			%	Q.	%	Q.	%	Q.	%	Q.	%	Q.
1	1970	P.	0,114		0,140		0,145		0,127		0,109	
				1,03		1,04		1,06		0,99		1,10
		H.	0,117		0,146		0,154		0,126		0,120	
2	2855	P.	0,120		0,184		0,230		0,226		0,165	
				1,12		1,13		1,04		1,17		1,12
		H.	0,134		0,208		0,240		0,264		0,184	
3	2415	P.	0,130		0,200		0,198		0,146		0,097	
				1,18		1,13		1,16		1,16		1,12
		H.	0,153		0,226		0,229		0,169		0,109	
Durchschnittswert		P.	0,121		0,175		0,191		0,166		0,124	
				1,12		1,10		1,09		1,12		1,11
		H.	0,135		0,193		0,208		0,186		0,138	
Durchschnittlicher Verminderungsgrad des Q.						1,8% niedriger		2,7% niedriger		1,0% niedriger		0,9% niedriger

TABELLE VI.
Ergosterin und Traubenzucker.
(Traubenzucker 24 St. nach Zufuhr des Ergosterins).

Nr.	Körper- gewicht in Gramm	Zuckergehalt nach Stunden										
		vor		1		2		3		4		
		%	Q.	%	Q.	%	Q.	%	Q.	%	Q.	
1	1720	P.	0,126	1,09	0,131	0,95	0,141	1,16	0,162	1,09	0,160	1,02
		H.	0,137		0,125		0,164		0,176		0,163	
2	2060	P.	0,096	1,35	0,186	1,10	0,248	1,13	0,261	1,17	0,233	1,06
		H.	0,132		0,204		0,279		0,305		0,248	
3	2150	P.	0,157	1,18	0,204	1,05	0,228	1,11	0,239	1,13	0,251	1,10
		H.	0,186		0,214		0,256		0,271		0,275	
Durchschnitts- wert		P.	0,127	1,20	0,174	1,04	0,206	1,13	0,221	1,14	0,215	1,07
		H.	0,152		0,181		0,233		0,251		0,229	
Durchschnittlicher Verminderungsgrad des Q.					13,3% niedriger		5,8% niedriger		5,0% niedriger		10,8% niedriger	

IV. ASSIMILATION DES TAUBENZUCKERS BEI ZUFUHR VON ERGOSTERIN.

Hier wurden Kaninchen pro kg Körpergewicht anstatt 5 cem einer 10%igen Traubenzuckerlösung 10 cem einer 50%igen gegeben. Um den Einfluss des Ergosterins auf die Zuckerassimilation im Körper festzustellen, wurde 0,1 g Ergosterin pro Kaninchen 12 Stunden vor der Zufuhr des Zuckers per os verabreicht, und vor u. nach der Zuckerzufuhr der Blutzuckergehalt des peripheren Ohrvenenblutes stündlich ermittelt. Auch hier wurde der hyperglykämische Prozentsatz sowohl bei der Kontrolle als auch bei Zufuhr von Ergosterin bestimmt, und beide Prozentsätze miteinander verglichen.

Der durchschnittliche hyperglykämische Prozentsatz bei der Kontrolle betrug 68,3–129,7% und war 2–3 Stunden nach der

Zuckerzufuhr am grössten, während er sich bei der Zufuhr von Ergosterin auf 8,5–81,1% belief, 1 Stunde nach der Zuckerzufuhr sein Maximum aufwies und wie die Tabellen VII und VIII zeigen, mit der Zeit allmählich abnahm. 5 Stunden nach der Zuckerzufuhr mit Ergosterin besass er den kleinsten Wert, nämlich den von 8,5%.

Der hyperglykämische Prozentsatz bei Zufuhr von Ergosterin war 43,3–87,6% niedriger als der der Kontrolle.

Diese Herabsetzung des hyperglykämischen Prozentsatzes bei Mitzufuhr von Ergosterin wurde mit der Zeit nach der Zuckerzufuhr immer stärker, blieb aber 1 Stunde lang nach Zuckerzufuhr fast unverändert.

Daraus geht hervor, dass die Assimilation des Zuckers im Körper durch Zufuhr des Ergosterins gesteigert wird, und dass die Steigerung mit der Zeit allmählich zunimmt. Diese Steigerung der Zuckerassimilation scheint nur von der durch Ergosterin gesteigerten Glykogenbildung in der Leber herzurühren, weil der hyperglykämische Wert bei Zufuhr von Zucker mit Ergosterin, besonders im späteren Stadium viel kleiner ist als der bei Zufuhr von Zucker allein. Die alimentäre Hyperglykämie wird durch vorherige Zufuhr von Ergosterin herabgesetzt.

TABELLE VII (Kontrolle)

10 ccm 50%igen Traubenzuckers pro kg Körpergewicht.

Nr.	Körper- gewicht in Gramm	Zucker- gehalt vor der Fütterung %	Blutzucker nach Stunden									
			1		2		3		4		5	
			%	R.	%	R.	%	R.	%	R.	%	R.
1	1640	0,098	0,153	56,1	0,155	58,2	0,181	84,7	0,169	72,5	0,124	26,5
2	2000	0,092	0,155	68,5	0,271	194,6	0,269	192,4	0,238	158,7	0,219	138,0
3	1950	0,086	0,178	105,8	0,248	188,4	0,270	214,0	0,239	177,9	0,185	115,1
4	2660	0,110	0,196	78,2	0,243	120,9	0,238	116,4	0,259	135,5	0,218	98,2
5	2850	0,117	0,233	99,1	0,245	109,4	0,200	70,9	0,141	20,5	0,104	0,89
Durch- schnitts- wert		0,101	0,183	81,2	0,232	129,7	0,232	129,7	0,209	105,9	0,170	68,3

TABELLE VIII.
Ergosterin und Traubenzucker (50%).

Nr.	Körper- gewicht in Gramm	Zuckergehalt vor der Fütterung %	Blutzucker nach Stunden									
			1		2		3		4		5	
			%	R.	%	R.	%	R.	%	R.	%	R.
1	1640	0,094	0,205	118,1	0,146	55,3	0,176	87,2	0,098	4,3	0,095	1,1
2	2000	0,112	0,188	67,9	0,172	53,6	0,156	39,3	0,129	15,3	0,105	0,94
3	1950	0,100	0,167	67,0	0,170	70,0	0,147	47,0	0,137	37,0	0,105	5,0
4	2660	0,115	0,198	72,2	0,215	87,0	0,222	93,0	0,204	77,4	0,135	17,4
5	2850	0,111	0,200	80,2	0,219	97,2	0,208	87,4	0,162	45,9	0,135	21,6
Durchschnittswert		0,106	0,192	81,1	0,184	73,6	0,182	71,7	0,146	37,7	0,115	8,5
Vergleich mit der Kontrolle			0,1 %	nie- driger	43,3 %	nie- driger	44,7 %	nie- driger	64,4 %	nie- driger	87,6 %	nie- driger

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Resorption des Traubenzuckers im Darm von Kaninchen wird durch perorale Zufuhr des Sörensenschen Phosphatgemisches von $P_H=7,55$ gesteigert.

2. Die Assimilation des Traubenzuckers in der Kaninchenleber wird durch perorale Zufuhr des Sörensenschen Phosphatgemisches von $P_H=7,55$ gesteigert.

3. Die Assimilation des Traubenzuckers in der Leber wird durch vorherige perorale Zufuhr von Ergosterin gesteigert.

4. Die durch Fütterung von Traubenzucker erzeugte Hyperglykämie wird durch 12 Stunden vorher stattfindende Zufuhr von Ergosterin herabgesetzt.

Danach erscheint es mir wahrscheinlich, dass das Ergosterin im Sinne vermehrter Gallensäurebildung die Zuckerassimilation in der Leber fördert.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, den Herren Professoren Dr. T. Shimizu und Dr. K. Ando meinen herzlichsten Dank für ihre überaus freundliche Anleitung sowie ihre nützlichen

Anregungen bei Ausführung meiner Arbeit auszusprechen. Auch möchte ich Herrn M. Teraoka am physiologisch-chemischen Institute für seine Unterstützung bei meinen Versuchen bestens danken.

LITERATUR.

- Chikamori, S. (1932): Okayama Igakkai Zasshi, **44**, 308.
 „ (1932): „ **44**, 9.
 Fuzita, S. (1931): Jl. of Biochem., **13**, 219.
 „ (1932): Arb. d. med. Univ. Okayama, **3**, Heft 1.
 Higashi, S. (1931): Arb. d. med. Univ. Okayama, **2**, 396.
 Isaac, S. (1914): Zs. physiol. Chem. **89**, 78.
 Kuramoto, T. (1932): noch nicht veröffentlicht.
 Okamura, T. (1928): Jl. of Bioch., **8**, 361.
 „ (1930): Arb. d. med. Univ. Okayama, **2**, 245.
 Yuuki, H. (1932): Zs. physiol. Chem., **207**.

ÜBER DIE ZUCKERASSIMILATION DURCH GALLENSÄURE (III).

Über die Zuckerassimilation in der Leber bei Zufuhr von Ergosterin.

VON

HIDEO YUUKI.

*(Aus der gynäkologischen Klinik und dem physiologisch-chemischen Institut
der medizinischen Akademie zu Okayama. Ausgeführt unter der
Leitung von Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 8. April 1932)

In der zweiten Mitteilung (1932) habe ich bereits berichtet, dass die Zuckerassimilation in der Leber im Sinne vermehrter Gallensäurebildung durch Zufuhr von Ergosterin gesteigert wird, indem der hyperglykämische Wert bei Zufuhr von Ergosterin viel niedriger befunden wird als der bei Zufuhr von Zucker allein.

Neulich hat Chikamori (1932) bewiesen, dass das Glykogen der Leber von nüchternen Kaninchen durch perorale Zufuhr von Ergosterin sich vermehrt, und dass diese Vermehrung durch Zufuhr von Traubenzucker nach vorheriger Eingabe von Ergosterin weiter verstärkt wird. Auf Grund dieses Ergebnisses hat er die Ansicht ausgesprochen, dass die vermehrte Glykogenbildung in der Leber bei Zufuhr von Ergosterin auf der vermehrten Gallensäurebildung in der Leber beruhen dürfte.

Bekanntlich wird das Glykogen in der Leber nicht nur aus Zucker, sondern auch aus seinen Spaltungsprodukten, wie Milchsäure, und sogar aus Eiweissbausteinen und Fettsäuren gebildet. Bei hungernden Kaninchen wird also das Glykogen aus anderem Material gebildet, wenn das Leberglykogen des hungernden Kaninchens durch Zufuhr von Ergosterin allein vermehrt wird.

Neulich hat Fuzita (1932) experimentell bewiesen, dass die Glykogenbildung der hungernden Kaninchenleber aus d-Alanin durch Zufuhr von Cholsäure gefördert wird. Aus dem ersteren wird bekanntlich d-Milchsäure gebildet.

Einerseits um die Ergebnisse von Chikamori zu bestätigen und anderseits um den Einfluss des Ergosterins auf die Glykogenbildung der Leber aus Milchsäure zu erforschen, habe ich die Glykogenbildung der Leber von hungernden Kaninchen bei Zufuhr von Ergosterin ohne oder mit Milchsäure untersucht.

Experimenteller Teil.

Zum Versuch wurden weibliche kräftige Kaninchen, die 4 Tage lang in Hunger gehalten wurden, in 4 Gruppen geteilt verwendet.

Die erste Gruppe von diesen Kaninchen wurde zunächst als Kontrolle für die Glykogengehaltbestimmung gebraucht. Der zweiten Gruppe von Kaninchen wurde 12 Stunden vor dem Töten 0,1 g Ergosterin pro Kaninchen mittelst Schlundsonde per os verabreicht. Der dritten Gruppe wurde 1,8 g dl-Milchsäure pro kg Körpergewicht als 2 N-Natriumsalzlösung 3 Stunden vor dem Abtöten auch per os eingegeben. Der letzten, vierten Gruppe wurde 12 Stunden vor Tötung zuerst 0,1 g Ergosterin pro Kaninchen und dann 3 Stunden vor Tötung 1,8 g dl-Milchsäure pro kg Körpergewicht als 2 N-Natriumsalzlösung per os verabreicht.

Alle Gruppen von Tieren wurden einzeln durch Nackenschlag und Verblutung aus der Carotis getötet, und die schnell herausgeholte Leber genau abgewogen.

Das Glykogen der Leber wurde nach Iwasaki u. Mori unter Hydrolyse in Zucker verwandelt, dieser nach Bertrand bestimmt und als Glykogen berechnet angegeben.

I. GLYKOGENGEHALT DER HUNGERNDEN KANINCHENLEBER (KONTROLLE.)

Aus der Tabelle I erhellt, dass der Glykogengehalt der Leber von 4 Tage lang hungernden Kaninchen durchschnittlich 0,258% beträgt, obwohl er individuell ziemliche Schwankungen zeigt.

Der Glykogengehalt der Leber von 8 Kaninchen lag zwischen 0,044-0,480%.

TABELLE I (Kontrolle)
(während der Hungerperiode)

Körpergewicht		Lebergewicht g	Leberglykogen	
vor dem Hungern g	nach dem Hungern g		g	%
2440	2300	42,0	0,202	0,480
2450	2220	40,7	0,190	0,467
2700	2570	42,8	0,167	0,390
2415	2305	36,9	0,108	0,293
2100	1830	37,5	0,073	0,194
2300	2100	42,9	0,061	0,143
2550	2370	48,9	0,026	0,053
2500	2320	58,5	0,026	0,044
Durchschnittswert			0,107	0,258

II. BEI ZUFUHR VON ERGOSTERIN.

Bei diesem Versuch wurde an die hungernden Kaninchen 12 Stunden vor Abtöten Ergosterin allein per os verfüttert; nach im ganzen 4 Tagen wurde das Kaninchen unter Verblutung getötet.

Aus der Tabelle II lässt sich ersehen, dass der Glykogengehalt der Leber durchschnittlich der absoluten Menge nach 0,271 g, prozentual 0,649% beträgt, und verglichen mit dem während der Hungerperiode, absolut um 153,27%, prozentual um 151,55% vermehrt gefunden wird.

Die Glykogenbildung der hungernden Kaninchenleber wird also durch Zufuhr von Ergosterin gesteigert, wie Chikamori in seinem Versuch bewiesen hat.

III. BEI ZUFUHR VON MILCHSÄURE.

Diesmal wurde an die Kaninchen, die 4 Tage lang gehungert hatten, nur dl-Milchsäure verfüttert, und der Glykogengehalt der Leber in der gleichen Weise wie vorher untersucht.

Aus Tabelle III ergibt sich, dass der Glykogengehalt der Leber

TABELLE II.
(beim Ergosterinversuch).

Körpergewicht		Lebergewicht g	Leberglykogen	
vor dem Hungern g	nach dem Hungern g		g	%
2200	1980	37,0	0,390	1,054
2350	2180	36,9	0,296	0,802
2850	2600	45,1	0,284	0,630
2930	2650	48,5	0,284	0,586
2100	1900	35,7	0,202	0,566
2510	2200	43,7	0,237	0,543
2000	1900	50,5	0,272	0,539
2500	2300	42,1	0,202	0,470
Durchschnittswert			0,271	0,649
Vergleich mit dem Wert während der Hungerperiode			153,27 % höher	151,55 % höher

TABELLE III.
(beim Milchsäureversuch).

Körpergewicht		Lebergewicht g	Leberglykogen	
vor dem Hungern g	nach dem Hungern g		g	%
1850	1650	40,6	0,544	1,316
2250	2050	39,2	0,508	1,295
2100	1900	38,2	0,436	1,141
2230	2020	40,0	0,390	0,975
2200	1960	39,9	0,296	0,742
2260	2140	37,3	0,202	0,542
2400	2150	46,2	0,202	0,437
2350	2200	48,7	0,178	0,367
Durchschnittswert			0,344	0,852
Vergleich mit dem Wert während der Hungerperiode			221,50 % höher	230,27 % höher

durchschnittlich der absoluten Menge nach 0,344 g, prozentual 0,852% beträgt. Dieser Glykogengehalt der Leber ist also im Vergleich mit dem während der Hungerperiode um 221,5% und prozentual um 230,27% vermehrt, und zeigt einen viel höheren Wert als bei Zufuhr von Ergosterin.

Die Glykogenbildung der Leber von hungernden Kaninchen tritt also bei Zufuhr von Milchsäure viel stärker auf als bei Zufuhr von Ergosterin.

IV. BEI ZUFUHR VON MILCHSÄURE UND ERGOSTERIN.

Bei diesem Versuch wurde an die hungernden Kaninchen zuerst das Ergosterin und nach 9 Stunden Milchsäure verfüttert, und der Glykogengehalt der Leber wieder in gleicher Weise bestimmt.

TABELLE IV.
(beim Ergosterin-Milchsäure-Versuch).

Körpergewicht		Lebergewicht g	Leberglykogen	
vor dem Hungern g	nach dem Hungern g		g	%
2500	2350	38,5	0,544	1,413
2400	2150	41,8	0,532	1,272
2600	2450	48,6	0,590	1,216
2100	1950	47,1	0,531	1,129
2100	1980	45,2	0,508	1,123
1950	1800	41,2	0,460	1,117
2220	2050	43,0	0,436	1,013
2300	2170	46,6	0,424	0,910
Durchschnittswert			0,503	1,149
Vergleich mit dem Wert während der Hungerperiode			370,09 % höher	345,35 % höher
Vergleich mit dem Wert beim Ergosterinversuch			85,61 % höher	77,04 % höher
Vergleich mit dem Wert beim Milchsäureversuch			46,22 % höher	34,86 % höher

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Ergosterin und Milchsäure durchschnittlich der absoluten Menge nach 0,503 g, prozentual 1,149% beträgt, und, verglichen mit dem bei Zufuhr von Milchsäure allein, absolut um 46,22%, prozentual um 34,86% vermehrt wurde.

Und natürlich ist die Vermehrung im Vergleich mit dem Gehalt während der Hungerperiode stärker als im Vergleich mit dem Gehalt bei Zufuhr von Ergosterin allein.

Die Glykogenbildung der Leber von hungernden Kaninchen wird durch Zufuhr von Milchsäure gesteigert und durch Mitzufuhr von Ergosterin und Milchsäure noch weiter gefördert, wenn das Ergosterin 9 Stunden früher als die Milchsäure an die hungernden Kaninchen verfüttert wird.

Diese die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung des Ergosterins scheint mir wahrscheinlich auf der vermehrten Gallensäurebildung der Leber aus Ergosterin zu beruhen.

Die die Glykogenbildung der Leber aus Milchsäure fördernde Wirkung der Gallensäure wurde bereits von Teraoka (1932) bewiesen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Glykogenbildung der Leber von hungernden Kaninchen wird sowohl bei als auch ohne Zufuhr von Milchsäure durch Verfütterung von Ergosterin gesteigert.

2. Diese Steigerung tritt bei Mitzufuhr von Milchsäure viel stärker auf als bei Zufuhr von Ergosterin allein.

Die Glykogenbildung der Leber aus Milchsäure wird andererseits durch vorherige Zufuhr von Ergosterin vermehrt.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, den Herren Professoren Dr. T. Shimizu und Dr. K. Ando meinen herzlichsten Dank für ihre überaus freundliche Anleitung sowie ihre nützlichen Anregungen bei Ausführung meiner Arbeit auszusprechen. Auch danke ich Herrn M. Teraoka am physiologisch-chemischen Institut für seine Unterstützung bei meinen Versuchen bestens.

LITERATUR.

- Chikamori, S. (1932): Okayama Igakkai Zasshi, **44**, 308.
Fujita, S. (1932): Arb. Med. Univ. Okayama, **3**. Heft I.
Teraoka, M. (1932): Bioch. Zs.
Yuuki, H. (1932): Zs. physiol. Chem., **207**.

DIE BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEN- HYDRATSTOFFWECHSEL. XXII.

Der Einfluss des Gallenverlustes auf die Zuckertoleranz beim Gallenfistelhunde.

VON

TOSHIYUKI TANAKA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama.
Vorstand:..Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 26. Januar 1932)

Es ist bereits bekannt, dass die Gallensäure nicht nur die Verdauung des Fettes und der Nukleinsäure fördert, sondern auch eine choleretische und chologogische Wirkung zeigt, indem sie den enterohepatischen Kreislauf bildet. Was den fördernden Einfluss der Gallensäure auf die Nukleinverdauung anbelangt, so ist er von Okamura Takeji (1930, 1928) und Kuramoto (1931) nachgewiesen worden. Ausser ihrer choleretischen Wirkung in der Leber kommt der Gallensäure noch eine grosse Bedeutung für den Kohlehydratstoffwechsel zu, was schon von vielen Autoren, wie z. B. Misaki (1927), Murakami (1928), Okamura (1928), Tsuji (1930), Fujita (1930/31) usw., dargetan worden ist.

Nach ihnen soll die Glykogenbildung der Leber sowohl aus Zucker als auch aus Eiweissbausteinen durch Gallensäure gefördert werden, indem diese gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt. Auf diese Weise soll der Kohlehydratstoffwechsel durch Gallensäure wie durch ein Hormon reguliert werden, indem der Zucker nach Bedarf in den allgemeinen Blutkreislauf eingeführt wird, was einen konstanten Blutzuckerwert zur Folge hat.

Bekanntlich wird der Blutzuckergehalt sowohl durch das chemische Hormon als auch durch das vegetative Nervensystem beeinflusst, die beide in einem innigen Zusammenhange miteinander stehen. In der Tat haben Tsuji (1930), Taku (1928, 1930), Sekitoo (1929/30) und Kaziro (1929) gefunden, dass die Gallen-

säure auf den Sympathicus lähmend, auf den Vagus reizend einwirkt.

Nach Macleod (1923) und Hoshi (1926) wird die innere Sekretion des Pankreas vom Vagus beherrscht, durch dessen Reiz die Sekretion von Insulin gesteigert wird, was zur Assimilation des Zuckers dient.

Bekanntlich hängt die durch perorale oder intravenöse Zufuhr von Zucker erzeugte experimentelle Hyperglykämie stark von der Leberfunktion ab. Nach Oka (1922) tritt die durch perorale Zufuhr von Zucker erzeugte experimentelle Hyperglykämie beim Eck'schen Fistelhunde viel auffallender in die Erscheinung als beim normalen. Aus den Daten hat er geschlossen, dass für die Zuckerassimilation im Organismus die Leber eine wichtige Rolle spielt. Durch die Untersuchungen vieler Autoren, wie z. B. Rosenfeld (1907), Woodyatt (1915) u. Macleod (1927), wurde der Beweis erbracht, dass der den Organismus belastende Zucker je nach der zugeführten Menge im Harn quantitativ ausgeschieden wird, wenn die Zuckermenge die Assimilationsgrenze im Organismus übertrifft. Was das Schicksal des den Organismus belastenden Zuckers betrifft, so wird allgemein angenommen, dass er entweder zur Verbrennung und Synthese des Glykogens verbraucht oder in Fett umgewandelt wird.

Seit Minkowski wird von vielen Autoren, wie z. B. Otto (1901) und Anderson (1929), behauptet, dass die Umwandlung des Traubenzuckers in Glykogen eine Vorbedingung für den normalen Verbrauch des Zuckers sei. Wie bereits erwähnt, fördert die Gallensäure die Glykogenbildung der Leber, wirkt hypoglykämisch und setzt sogar die Zuckerausscheidung im Harn herab; für letzteres haben Taku (1930) und Fujita (1930) den Beweis geliefert. Neuerdings hat Chikamori (1931) bewiesen, dass das Glykogen der Leber von Kaninchen durch Ableitung der Galle nach aussen stark vermindert wird oder sogar verschwindet. Weiter hat Okamura Teiji (1928) gefunden, dass die Adrenalinsekretion der Nebenniere von Kaninchen beim Verluste der Galle aus einer Gallenfistel nach aussen vermehrt wird, was zur Glykogenmobilisation der Leber führen dürfte, weil durch das Adrenalin

bekanntlich das Leberglykogen mobilisiert wird.

Nach Miki (1931) soll die die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung der Gallensäure mit der Funktion des vegetativen Nervensystems in innigem Zusammenhange stehen, indem sie mehr vom sympathischen als vom vagischen System abhängt.

Das den Sympathicus reizende Adrenalin wirkt aber entweder Leberglykogen-mobilisierend oder im Gegenteile aufbauend; die letztere dieser beiden Auffassungen wird von Drummond (1904), Pollak (1909), Kuriyama (1918) und Geiger (1930) vertreten. Die Meinungen über die Wirkung des Adrenalins auf das Leberglykogen sind somit je nach den Autoren verschieden. Nach Miki (1931) soll Adrenalin bei gesteigertem sympathischen Tonus das Leberglykogen mobilisierend wirken, während es bei vermindertem dagegen aufbauend einwirken soll. Um die Erkenntnis der Adrenalin- und Gallensäurewirkung weiter zu fördern, habe ich die Wirkung des Adrenalins unter Belastung mit Zucker beim Gallenblasenfistel tragenden Hunde untersucht; das Adrenalin wirkt ja bekanntlich gegen die die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung der Gallensäure antagonistisch. Andererseits wurde der Einfluss des Gallenverlustes aus der Gallenblasenfistel des Hundes auf die experimentelle, durch Zufuhr von Zucker erzeugte Hyperglykämie und auf die Adrenalinhyperglykämie mit oder ohne Zufuhr von Gallensäure untersucht, um den Wirkungsmechanismus der Gallensäure und des Adrenalins auf die Zuckerassimilation im Organismus klarzustellen.

Experimenteller Teil.

I. DIE ZUCKERTOLERANZ BEI ODER OHNE ABLEITUNG DER GALLE VON EINEM FISTELHUNDE NACH AUSSEN.

Zuerst wurde einer Hündin eine permanente Gallenblasenfistel nach Bickel angelegt, und durch Operation ihre Scheide weit geöffnet, um das Katheterisieren des Harnes leicht ausführen zu können. Nachdem sich die Hündin von der Operation erholt hatte, wurde der Versuch ausgeführt. Während des Versuches wurde

eine bestimmte Nahrung täglich zu bestimmter Zeit verabreicht. Um 8 Uhr morgens wurde der Harn durch Katheterisieren ausgelassen, und die Harnblase mit 2% iger Borsäurelösung gut nachgewaschen, um den letzten Tropfen des Harnes auszuleeren. Danach wurde der nüchterne Blutzuckergehalt bestimmt; hierauf wurde nach intravenöser Zufuhr von 6 ccm pro Kilo einer 50%igen Tranbenzuckerlösung der Blutzuckergehalt nach je einer Stunde untersucht. Während dieser Blutuntersuchung habe ich die Hündin ihre eigene Galle aus der Gallenblasenfistel ruhig ablecken lassen. Der Harn wurde bis 8 Uhr des nächsten Morgens durch Katheterisieren gesammelt und der Zuckergehalt im 24stündigen Harne nach Bertrand bestimmt.

Nach diesem Versuche wurde die Hündin unter Ernährung durch eine bestimmte Nahrung einige Tage lang ruhig gehalten, um sich zu erholen. Bei einem zweiten Versuche wurde dann die Galle aus der Gallenblasenfistel unter Verhinderung jedes Ableckens nach aussen abgeleitet und in einen Kolben gesammelt, und zwar 2 Tage lang von 8 Uhr morgens bis zur gleichen Zeit am übernächsten Tage.

Natürlich wurde der Hündin am ersten Tage das nämliche Futter wie vorher verabreicht, und am 2. Tage wurde zur selben Zeit die gleiche, obengenannte Behandlung ausgeführt. Auf diese Weise wurden die Zuckergehalt des Blutes und des Harnes den beiden Versuchen, ohne und mit Ableitung der Galle aus der Gallenblasenfistel nach aussen, miteinander verglichen, um den Einfluss des Gallensäureverlustes auf die Zuckertoleranz des Hundes zu erkennen. Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena saphena, die Blutzuckerbestimmung nach der Methode von Hagedorn u. Jensen.

Die Resultate sind in den Tabellen I und II zusammengestellt.

Ergebnisse.

Aus Tabelle I A und B erhellt, dass der nüchterne Blutzucker bei Ablecken der eigenen Galle durchschnittlich 0,089%, bei Ableitung der Galle aus der Gallenblasenfistel nach aussen 0,088% beträgt, während er im ersteren Falle nach der Belastung mit

TABELLE I A.
Glukose ohne Gallenverlust.

Hündin	Körper- gewicht (kg)	Datum der Operation	Datum des Versuches	Blutzucker vor der Injektion	Blutzucker nach Stunden:		
					1	2	3
A	13.0	17/4	1/6	0.091	0.158	0.087	0.094
A	13.0	17/4	10/6	0.093	0.155	0.087	0.091
A	13.0	17/4	5/7	0.088	0.163	0.092	0.090
B	10.0	28/5	9/6	0.080	0.124	0.081	0.076
C	9.0	29/5	9/7	0.094	0.124	0.094	0.087
Durchschnittswert				0.089	0.145	0.088	0.088

TABELLE I B.
Glukose bei Gallenverlust.

Hündin	Datum des Versuches	Gallen- verlust in St.	Blutzucker vor der Injektion	Blutzucker nach Stunden:			
				1	2	3	4
A	5/6	48.0	0.082	0.179	0.094	0.083	0.082
A	15/6	„	0.092	0.145	0.112	0.096	0.090
A	10/7	„	0.091	0.148	0.121	0.102	9.090
B	13/6	„	0.086	0.116	0.104	0.091	0.088
C	14/7	„	0.092	0.114	0.109	0.092	0.096
Durchschnittswert			0.088	0.140	0.108	0.093	0.089

TABELLE II A.
Glukose ohne Gallenverlust.

Hündin	Datum des Ver- suches	Harn- menge (ccm)	Reaktion	Spez. Gew.	Zuckergehalt		Unaus- genutzter Zucker in %
					(g)	(%)	
A	1/6	910	schwach sauer	1026	1.975	0.217	5.06
A	10/6	750	„	1028	1.426	0.190	3.66
A	5/7	750	neutral	1024	1.759	0.235	4.51
B	9/6	620	sauer	1024	1.147	0.185	3.82
C	9/7	670	neutral	1018	0.764	0.114	3.20
Durchschnittswert					1.414	0.191	4.06

TABELLE II B.
Glukose bei Gallenverlust.

Hündin	Datum des Ver- suches	Gallen- verlust in St.	Harn- menge (ccm)	Reaktion	Spez. Gew.	Zucker- gehalt		Unaus- genutzter Zucker in %
						(g)	(%)	
A	5/6	48.0	890	neutral	1024	4.185	0.470	10.73
A	15/6	„	730	schwach sauer	1024	3.126	0.428	8.02
A	10/7	„	730	neutral	1023	3.415	0.468	8.76
B	13/6	„	550	sauer	1026	3.100	0.564	10.33
C	14/7	„	500	schwach alkalisch	1022	1.262	0.252	4.67
Durchschnittswert						3.018	0.455	8.67

Zucker nach einer Stunde 0.124–0.163%, durchschnittlich 0.145% beträgt und nach 2 Stunden schon den normalen nüchternen Wert zeigt. Somit wird der Blutzucker eine Stunde nach Zufuhr des Traubenzuckers im Vergleiche zu dem nüchternen durchschnittlich um 62.33% gesteigert. Bei Ableitung der Galle nach aussen beträgt der Blutzuckergehalt eine Stunde nach Zufuhr des Zuckers 0.114–0.179%, durchschnittlich 0.140%. Somit zeigt der durchschnittliche Blutzuckergehalt bei Ableitung der Galle nach aussen im Vergleich zu dem ohne Ableitung der Galle anfänglich weder vermehrten noch verminderten Wert, während er im späteren Stadium nach Belastung mit Zucker einen etwas höheren Wert zeigt. Der Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel scheint die künstlich durch Zufuhr von Zucker erzeugte Hyperglykämie nämlich länger zu erhalten, und der hyperglykämische Wert kehrt erst nach 4 Stunden wieder zum Anfangswerte zurück.

Hinsichtlich des Zuckergehaltes im Harn wurde gefunden, dass er ohne Ableitung der Galle nach aussen der absoluten Menge nach 0.764–1.975 g, durchschnittlich 1.414 g, beträgt, und dass der Zucker der zugeführten Zuckermenge zu 3.2–5.06%, durchschnittlich 4.063%, ausgeschieden wird, während er bei Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel der absoluten Menge nach 1.262–4.185 g,

durchschnittlich 3.018 g, beträgt, und der zugeführte Zucker zu 4.67–10.73%, durchschnittlich um 8.671%, im Harne ausgeschieden wird, wie aus Tabelle II A und B erhellt. Die Zuckerausscheidung im Harne der Fistelhündin wird bei Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel somit gegenüber der Zuckerausscheidung ohne Gallenverlust etwa um das Doppelte gesteigert.

Aus den Daten geht hervor, dass der Gallenverlust aus dem Hundeorganismus die alimentäre Hyperglykämie verlängert, die alimentäre Glykosurie vermehrt, und zwar wird die Zuckertoleranz der Hündin durch Verlust der Galle aus der Gallenblasenfistel nach aussen stark herabgesetzt. Diese Daten stimmen einigermassen gut damit überein, dass der Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel von Kaninchen nach Okamura Teiji (1928) eine Hyperglykämie verursacht.

Wie oben schon erwähnt, fördert die Gallensäure die Glykogenbildung der Leber, während die Zuckerausscheidung durch Gallensäurezufuhr herabgesetzt wird. Daher scheint die Herabsetzung der Zuckertoleranz bei Gallenverlust durch den Gallensäureverlust im Organismus bedingt zu sein, weil die Gallensäure in der Galle bei Ableitung der Galle aus der Gallenblasenfistel nach aussen sich allmählich vermindert. In diesem Sinne habe ich den folgenden Versuch ausgeführt.

II. DIE ZUCKERTOLERANZ BEI WIEDERZUFUHR DER CHOLSÄURE IN DIE HÜNDIN, DIE IHRE EIGENE GALLE AUS DER GALLENBLASENFISTEL VERLOREN HATTE.

Obwohl die Fistelhündin bei Aufnahme einer bestimmten Nahrung ruhig ihre eigene Galle aus der Gallenblasenfistel ableckt und augenscheinlich gesund bleibt, so vermindern sich doch die Gallenmenge und deren spezifisches Gewicht nach der Fistelanlegung allmählich, wie aus Tabelle III erhellt. Daher muss schon in dieser Zeit eine beträchtliche Funktionsstörung der Leber vorliegen. In der Tat wurde bei einer Fistelhündin eine so beträchtliche Herabsetzung der Zuckertoleranz beobachtet, dass in Belastungsversuche mit Zucker von der Hündin A vom 1. Juli bis

TABELLE III.

Versuchs-Nr.	Datum der Operation	Datum des Versuches	Gallenmenge in 24 St. (cem)	Spez. Gew.
1	17/IV	4/6- 5/6	155.0	1016
		14/6-15/6	155.0	1016
		27/6-28/6	170.0	1015
		9/7-10/7	150.0	1015
		8/8- 9/8	145.0	1014
2	28/V	12/6-13/6	122.0	1017
		22/6-23/6	122.0	1015
		3/7- 4/7	120.0	1014
3	14/VI	29/6-30/6	182.0	1013
		7/8- 8/8	172.0	1012

5. Juli 1.426-1.975 g Zucker im Harne ausgeschieden wurde, während zu einem späteren Zeitpunkte, am 5 August desselben Jahres, 4.837 g Zucker in 24 Stunden im Harne gefunden wurden, nachdem der Fistelhündin dieselbe Menge von Zucker pro Kilo einverleibt worden war (siehe Tabelle II A und Tabelle V B).

Auf Grund dieser Tatsachen habe ich als Kontrolle stets zuerst die Zuckerbelastungsversuche ohne Ableitung der Galle nach aussen an derselben Fistelhündin angestellt und zwar ohne oder mit Zufuhr von Gallensäure. Zuerst wurde den Fistelhündinnen, die bei bestimmter Nahrung gehalten worden waren, 6 cem einer 50%igen Traubenzuckerlösung pro Kilo intravenös, und bald danach 1 cem einer 1%igen Natriumcholatlösung pro Kilo ebenfalls intravenös eingespritzt, und der Zuckergehalt des Blutes sowie des Harnes untersucht. Nach einer 4tägigen Pause wurde denselben Hündinnen nur Traubenzuckerlösung, und wiederum nach 4 Tagen unter Ableitung der Galle aus der Gallenblasenfistel nach aussen Traubenzuckerlösung mit Cholsäure intravenös verabreicht, und der Blutzuckergehalt des Blutes und des Harnes genau wie vorher ermittelt. Diese ermittelten Zuckerwerte der drei Versuchsreihen wurden mit einander verglichen, um zu sehen, ob die durch Gallenverlust

herabgesetzte Zuckertoleranz durch Zufuhr von Cholsäure wieder normal hergestellt werden kann.

Die Resultate sind in den Tabellen IV A, B u. C und V A, B u. C zusammengestellt.

TABELLE IV A.
Glukose und Cholsäure ohne Gallenverlust.

Hündin	Körpergewicht (kg)	Datum der Operation	Datum des Versuches	Blutzucker vor der Injektion	Blutzucker nach Stunden:			
					1	2	3	4
A	13.0	17/4	30/7	0.086	0.084	0.077	0.084	0.093
D	15.0	14/6	31/7	0.089	0.084	0.098	0.098	0.089
E	12.0	25/6	1/8	0.096	0.100	0.081	0.088	0.095
Durchschnittswert				0.090	0.089	0.085	0.090	0.092

TABELLE IV B.
Glukose ohne Gallenverlust.

Hündin	Datum des Versuches	Blutzucker vor der Injektion	Blutzucker nach Stunden:		
			1	2	3
A	5/8	0.100	0.144	0.094	0.101
D	4/8	0.098	0.148	0.089	0.095
E	6/8	0.089	0.147	0.083	0.092
Durchschnittswert		0.096	0.146	0.089	0.096

TABELLE IV C.
Glukose und Cholsäure bei Gallenverlust.

Hündin	Datum des Versuches	Gallenverlust in St.	Blutzucker vor der Injektion	Blutzucker nach Stunden:			
				1	2	3	4
A	9/8	48	0.093	0.116	0.100	0.093	0.100
D	8/8	„	0.092	0.110	0.092	0.094	0.092
E	10/8	„	0.091	0.118	0.093	0.095	0.088
Durchschnittswert			0.092	0.115	0.095	0.094	0.093

TABELLE V A.
Glukose und Cholsäure ohne Gallenverlust.

Hündin	Datum des Ver- suches	Harn- menge (ccm)	Reaktion	Spez. Gew.	Zuckergehalt		Unaus- genutzter Zucker in %
					(g)	(%)	
A	30/7	800	neutral	1019	2.920	0.365	7.49
D	31/7	930	schwach sauer	1020	3.561	0.383	7.91
E	1/8	600	neutral	1023	5.470	0.912	15.19
Durchschnittswert					3.984	0.513	9.96

TABELLE V B.
Glukose ohne Gallenverlust.

Hündin	Datum des Ver- suches	Harn- menge (ccm)	Reaktion	Spez. Gew.	Zuckergehalt		Unaus- genutzter Zucker in %
					(g)	(%)	
A	5/8	930	neutral	1021	4.837	0.520	12.40
D	4/8	800	„	1022	7.325	0.916	16.28
E	6/8	610	schwach sauer	1026	8.595	1.409	23.88
Durchschnittswert					6.919	0.926	17.30

TABELLE V C.
Glukose und Cholsäure bei Gallenverlust.

Hündin	Datum des Ver- suches	Gallen- verlust in St.	Harn- menge (ccm)	Reaktion	Spez. Gew.	Zuckergehalt		Unaus- genutzter Zucker in %
						(g)	(%)	
A	9/8	48.0	930	neutral	1020	4.175	0.449	10.71
D	8/8	48.0	800	schwach alkalisch	1022	7.083	0.885	15.74
E	10/8	48.0	630	neutral	1026	7.109	1.128	19.75
Durchschnittswert						6.122	0.778	15.31

Ergebnisse.

Aus Tabelle IV B erhellt, dass der Zuckergehalt des Blutes eine Stunde nach der Zuckerzufuhr 0.144–0.148%, durchschnittlich 0.146% beträgt und im Vergleiche zu dem vor der Zuckerzufuhr durchschnittlich um 52.96% gesteigert wird. Nach 3 Stunden ist er wieder zum Werte vor der Zuckerzufuhr zurückgekehrt. Dieses Ergebnis stimmt gut mit dem des vorigen Versuches überein (vergleiche damit Tabelle I A). Bei diesem Versuche wird der Zucker im Harne mit 4.837–8.595 g, durchschnittlich mit 6.919 g in 24 Stunden gezeigt. Somit wird die eingeführte Zuckermenge im Harne wieder zu 17.3% ausgeschieden. Bei Zufuhr von Cholsäure unter gleichen Bedingungen tritt nach einer Stunde eine leichte Hyperglykämie oder Hypoglykämie ein, und zwar weist der Zuckergehalt bei Hyperglykämie im Vergleiche zu dem vor der Zuckerzufuhr mit Cholsäure einen um 4.17% höheren Wert auf. Nach 2 Stunden tritt eine deutliche Hypoglykämie ein, und nach 3 Stunden ist der Zuckergehalt wieder zu dem Werte vor der Zuckerzufuhr mit Cholsäure zurückgekehrt. Der Zuckergehalt des 24 stündigen Harnes bei Zufuhr von Cholsäure beträgt hierbei 2.92–5.47 g, durchschnittlich 3.984 g, und von der eingeführten Zuckermenge werden 9.96% im Harne wieder ausgeschieden, wie Tabelle V A zeigt. Aus den Daten geht hervor, dass die Zuckertoleranz der Fistelhündin ohne Ableitung der Galle nach aussen durch Zufuhr von Cholsäure eine Steigerung erfährt.

Zuletzt wird bei Zufuhr von Zucker mit Cholsäure bei Ableitung der Galle aus der Gallenblasenfistel nach aussen der Blutzuckergehalt eine Stunde nach der Zuckerzufuhr mit 0.110–0.118%, durchschnittlich mit 0.115% gezeigt, und im Vergleiche mit dem vor der Zuckerzufuhr um 24.64% gesteigert. Somit wird der hyperglykämische Wert des Blutzuckers bei Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel durch Zufuhr von Cholsäure stark herabgedrückt (vergleiche damit Tabelle I B u. IV A).

Dieser durch Zufuhr von Cholsäure herabgedrückte Zuckervert des Blutes bei Gallenverlust ist höher als der bei Zufuhr von Cholsäure ohne Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel, wie aus

Tabelle IV_B und c erhellt. 2-3 Stunden nach der Zuckerzufuhr mit Cholsäure wird noch eine leichte Hyperglykämie beobachtet.

Die Hyperglykämie durch Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel hält sich nämlich viel höher und länger als die ohne Gallenverlust, obwohl in beiden Fällen die Cholsäure mitzugeführt wird.

Bei dem letzten Versuche wurde der Zuckergehalt im Harne von 24 Stunden als 4.175-7.109 g, durchschnittlich als 6.122 g gefunden.

Somit wird der eingeführte Zucker im Harne wieder zu 15.31% ausgeschieden, und diese Zuckerausscheidung im Harne ist viel kleiner als die bei Zuckerzufuhr ohne Ableitung der Galle nach aussen, aber viel grösser als die bei Zuckerzufuhr mit Cholsäure ohne Ableitung der Galle nach aussen, wie aus Tabelle V_A, B u. c erhellt.

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass beim Zuckerbelastungsversuche der Fistelhündin sowohl mit als auch ohne Ableitung der Galle nach aussen die Zuckertoleranz durch Zufuhr einer adäquaten Menge von Cholsäure gesteigert, und die durch Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel herabgesetzte Zuckertoleranz der Gallenblasenfistelhündin durch Zufuhr von Cholsäure fast zur Norm hergestellt wird, ja dass sogar diese durch Zufuhr von Cholsäure gesteigerte Zuckertoleranz viel stärker auftritt als diejenige ohne Ableitung der Galle nach aussen aus der Gallenblasenfistel. Aus den Daten lässt sich wohl der Schluss ziehen, dass die Herabsetzung der Zuckertoleranz bei Gallenverlust aus dem Organismus hauptsächlich auf dem Mangel an Gallensäure in der Galle bzw. im Körper beruht.

III. DIE ZUCKERTOLERANZ BEI ZUFUHR VON TRAUBENZUCKER MIT ADRENALIN OHNE ODER MIT GALLENVERLUST AUS DER GALLENBLASENFISTEL.

Der die Gallenblasenfistel tragenden Hündin wurden 6 ccm einer 50%igen Traubenzuckerlösung pro Kilo intravenös, und bald danach 0.02 ccm einer 0.1%igen Adrenalinchloridlösung pro Kilo subkutan verabreicht. Vor und nach der Zuckerzufuhr wurde der

Zuckergehalt des Blutes stündlich untersucht und im 24stündigen Harne ermittelt.

Dieser Versuch wurde sowohl bei als auch ohne Ableitung der Galle nach aussen in genau der gleichen Weise wie die vorherigen Versuche ausgeführt.

Die Resultate sind in den Tabellen VI A u. B und VII A u. B zusammengestellt.

TABELLE VI A.
Glukose und Adrenalin ohne Gallenverlust.

Hündin	Körpergewicht (kg)	Datum der Operation	Datum des Versuches	Blutzucker vor der Injektion	Blutzucker nach Stunden:		
					1	2	3
A	13.0	17/4	17/6	0.095	0.155	0.093	0.092
B	10.0	28/5	19/6	0.094	0.158	0.091	0.089
B	10.0	„	29/6	0.088	0.128	0.087	0.086
C	9.0	29/5	22/6	0.087	0.201	0.076	0.083
D	15.0	14/6	26/6	0.099	0.143	0.092	0.090
Durchschnittswert				0.093	0.157	0.088	0.088

TABELLE VI B.
Glukose und Adrenalin bei Gallenverlust.

Hündin	Datum des Versuches	Gallenverlust in St.	Blutzucker vor der Injektion	Blutzucker nach Stunden:			
				1	2	3	4
A	28/6	48.0	0.088	0.139	0.104	0.097	0.090
B	24/6	72.0	0.094	0.163	0.108	0.106	0.094
B	4/7	48.0	0.090	0.137	0.100	0.091	0.095
C	2/7	72.0	0.098	0.105	0.100	0.096	0.091
D	1/7	„	0.087	0.183	0.115	0.101	0.091
Durchschnittswert			0.091	0.145	0.105	0.098	0.092

TABELLE VII A.
Glukose und Adrenalin ohne Gallenverlust.

Hündin	Datum des Ver- suches	Harn- menge (cem)	Reaktion	Spez. Gew.	Zuckergehalt		Unaus- genutzter Zucker in %
					(%)	(g)	
A	17/6	920	neutral	1024	4.925	0.535	12.63
B	19/6	540	schwach sauer	1030	7.846	1.453	26.15
B	29/6	680	sauer	1024	5.290	0.778	17.63
C	22/6	550	„	1025	2.492	0.453	9.23
D	26/6	800	„	1022	5.275	0.659	11.72
Durchschnittswert					5.166	0.776	15.47

TABELLE VII B.
Glukose und Adrenalin bei Gallenverlust.

Hündin	Datum des Ver- suches	Gallen- verlust in St.	Harn- menge (cem)	Reaktion	Spez. Gew.	Zucker- gehalt		Unaus- genutzter Zucker in %
						(g)	(%)	
A	28/6	48.0	810	schwach alkalisch	1024	3.510	0.433	9.00
B	24/6	72.0	450	alkalisch	1032	4.500	1.000	15.00
B	4/7	48.0	680	neutral	1024	4.125	0.666	13.75
C	2/7	72.0	450	„	1019	1.426	0.317	5.28
D	1/7	72.0	720	schwach sauer	1020	3.160	0.439	7.02
Durchschnittswert						3.344	0.571	10.01

Ergebnisse.

Aus Tabelle VI A u. B erhellt, dass bei Zufuhr von Zucker mit Adrenalin ohne Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel der Hündin nach aussen der Blutzuckergehalt eine Stunde nach der Zuckerzufuhr 0.128–0.201%, durchschnittlich 0.157% beträgt; und zwar ist er im Vergleiche zu dem vor der Zuckerzufuhr um 69.55% gesteigert. Wenn dieser Zuckerwert des Blutes mit dem des Zuckerbelastungsversuches ohne Gallenverlust nach aussen ver-

glichen wird, so zeigt er sich als viel höher (siehe Tabelle I A). Aber nach 2 Stunden zeigt der Blutzuckergehalt einen viel niedrigeren Wert, als der vor Zuckerzufuhr war. In diesem Falle beträgt der Zuckergehalt im 24stündigen Harne 2.492–7.846 g, durchschnittlich 5.166 g und der eingeführte Zucker wird im Harne wieder zu 15.47% ausgeschieden. Die Zuckerausscheidung bei Zufuhr von Zucker mit Adrenalin wird also im Vergleiche zu der bei Zufuhr von Zucker allein deutlich vermehrt, wie auch Satoh (1923) in seinem Versuche gezeigt hat. Somit wird die Zuckertoleranz der Fistelhündin ohne Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel durch Zufuhr von Adrenalin herabgesetzt, vielleicht indem dadurch die Glykogenbildung der Leber gehemmt wird. Aber wenn die Hündin ihre eigene Galle aus der Gallenblasenfistel 24 Stunden lang nicht abgeleckt hat, so erscheint der Blutzuckergehalt eine Stunde nach der Zuckerzufuhr mit Adrenalin mit 0.105–0.183%, durchschnittlich mit 0.145% und ist im Vergleiche zu dem vor der Zuckerzufuhr um 59.08% vermehrt. Dieser Zuckergehalt ist kleiner als der ohne Ableitung der Galle nach aussen. Der Zuckergehalt im Blute beträgt nach 2 Stunden durchschnittlich 0.105% und nach 3 Stunden 0.098%. Erst nach 4 Stunden stellt sich der Blutzuckergehalt wieder auf den Wert vor der Zuckerzufuhr ein. Somit dauert die Hyperglykämie viel länger als die ohne Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel. Diese dauerhafte Hyperglykämie beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass die Gallensäure, die gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt, wegen der Ableitung der Galle nach aussen sich im Körper vermindert, und dass das dabei vermehrte Adrenalin lange Zeit Leberglykogenmobilisierend wirkt. Was die Zuckerausscheidung im Harne bei Zufuhr von Adrenalin unter gleichzeitigem Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel anbetrifft, so ergibt sie sich als 1.426–4.50 g, durchschnittlich als 3.344 g, was 10.01% des eingeführten Zuckers ausmacht. Diese Zuckerausscheidung im Harne ist im Vergleiche zu der bei Ablecken der eigenen Galle viel kleiner.

Bei Ableitung der Galle nach aussen muss die Gallensäure im Körper vermindert, und dadurch die Hyperglykämie und Glykösurie durch Zufuhr von Adrenalin viel hochgradiger sein als die

bei Ablecken der eigenen Galle aus der Gallenblasenfistel. Nach Siegel (1929), Pollak (1909), Cori u. Cori (1929) sowie Ohara (1925) ist das Adrenalin in kleinsten Mengen ein Aufbauhormon des Leberglykogens, und durch Adrenalin findet die in der Leber vor sich gehende Resynthese eines Teiles der im Muskel gebildeten Milchsäure zu Glykogen ihre hormonale Förderung.

In diesem Sinne scheint mir die im Vergleiche zu der beim Ablecken der Galle verminderte Adrenalinhyperglykämie und Adrenalinglykosurie durch die das Glykogen aufbauende Wirkung einer kleinsten Adrenalinmenge bedingt zu sein.

Miki (1931) hat in seinen Versuchen bereits gefunden, dass bei splachnikotomierten Kaninchen die Glykogenbildung der Leber durch Zufuhr einer kleinsten Adrenalinmenge gesteigert, und dass diese das Glykogen aufbauende Wirkung des Adrenalins durch Zufuhr von Gallensäure weiter gefördert wird. Es ist sehr interessant, dass bei Ableitung der Galle nach aussen das Adrenalin eine mehr hypoglykämische und die Glykosurie herabsetzende Wirkung zeigt. Ob diese Wirkung tatsächlich auf der vermehrten Glykogenbildung beruht oder nicht, muss weiter verfolgt werden.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Zuckertoleranz der Fistelhündin ohne Ableitung der Galle nach aussen vermindert sich mit der Zeit allmählich, wird aber durch parenterale Zufuhr von Cholsäure (0.01 g pro Kilo) gesteigert.

2. Bei Ableitung der Galle aus der Gallenblasenfistel nach aussen wird die Zuckertoleranz der Fistelhündin beträchtlich herabgesetzt, indem die durch Zuckerbelastung erzeugte Hyperglykämie länger dauert und die Glykosurie stärker auftritt. Diese durch Gallenverlust herabgesetzte Zuckertoleranz wird durch Zufuhr von Cholsäure wieder zur Norm oder sogar übernormal hergestellt.

Aus den Daten geht hervor, dass die durch Gallenverlust herabgesetzte Zuckertoleranz auf den Mangel an Gallensäure im Organismus zurückzuführen ist.

3. Die Zuckertoleranz der Fistelhündin bei Ablecken der

Galle wird durch Zufuhr von kleinsten Adrenalinmengen herabgesetzt, indem die durch Zuckerbelastung erzeugte Hyperglykämie durch Adrenalin länger dauert, und die Glykosurie stärker auftritt, während bei Ableitung der Galle aus der Gallenblasenfistel nach aussen die Zuckertoleranz der Fistelhündin durch Zufuhr kleinster Adrenalinmengen gesteigert wird, indem die durch Zuckerbelastung erzeugte Glykosurie und Hyperglykämie sich dadurch vermindern, obwohl die Hyperglykämie dabei etwas länger dauert. Diese die Zuckertoleranz steigernde Wirkung des Adrenalins bei Gallenverlust aus der Gallenblasenfistel scheint mir darauf zu beruhen, dass das Adrenalin wegen Mangels an Glykogen in der Leber Glykogen-aufbauend gewirkt hat; der Glykogenmangel scheint auf der durch Gallenverlust verursachten Gallensäureverminderung zu beruhen.

Zum Schlusse möchte ich nicht verfehlen, Herrn Professor Dr. T. Shimizu für seine überaus freundliche Anleitung bei dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Anderson, M. D. u. Anderson, A. B. (1929): *Ergebn. d. Physiol.*, **29**, 370.
 Chikamori, S. (1931): *Okayama Igakkai Zasshi*, **43** Jg. 1946.
 Cori, C. F. u. Cori, G. T. (1929): *Bioch. Zs.*, **206**, 45.
 Drummond, W. B. u. Paton, D. N. (1904): *Jl. physiol.*, **31**, 92.
 Fujita, S. (1931): *Jl. of Bioch.*, **13**, 219.
 „ (1930): „ **12**, 383.
 Fujita, S. (1930): *Arb. Med. Univ. Okayama*, **2**, 151.
 Geiger, E. (1930): *Bioch. Zs.*, **223**, 190.
 Hoshi, T. (1926): *Tohoku Jl. exp. Med.*, **7**, 447.
 Kaziuro, K. u. Taku, A. (1929): *Jl. of Bioch.*, **11**, 203.
 Kuramoto, T. (1931): noch nicht veröffentlicht.
 Kuriyama, S. (1918): *Jl. biol. chem.*, **34**, 269.
 Macleod, J. J. R. (1927): *Kohlenhydratstoffwechsel und Insulin*.
 Macleod, J. J. R. (1923): *Brit. Med. Jl.*, **1923**, Jg., s. 165.
 Miki, T. (1932): *Jl. of Bioch.*, **15**, 167.
 Miki, T. (1931): noch nicht veröffentlicht.
 Misaki, K. (1927): *Jl. of Bioch.*, **8**, 235.
 Murakami, K. (1928): *Jl. of Bioch.*, **9**, 261.
 Ohara, T. (1925): *Tohoku Jl. exp. Med.*, **6**, 1.
 Oka, T. (1922): *Tohoku Jl. exp. Med.*, **3**, 206.

- Okamura, Takeji (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 245.
Okamura, Takeji (1928): Jl. of Bioch., **9**, 251.
Okamura, Takeji (1928): „ **9**, 271 u. 445.
Otto, A. (1901): Deutsch. Arch. f. Klin. Med., **71**, 263.
Pollak, L. (1909): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **61**, 149.
Satoh, K. (1923): Tohoku Jl. exp. Med., **4**, 312.
Sekitoo, T. (1929): Jl. of Bioch., **11**, 251.
Sekitoo, T. (1930): „ **11**, 391.
Sekitoo, T. (1930): „ **12**, 59.
Siegel, R. (1929): Klin. Wschr., **1929**, Jg. s. 1069.
Taku, A. (1928): Jl. of Bioch., **9**, 299.
Taku, A. (1930): „ **12**, 371.
Taku, A. (1929): Arb. Med. Univ. Okayama, **1**, 413
Tsuji, K. (1930): Jl. of Bioch., **12**, 139.

BEITRÄGE ZUR BESTIMMUNG DER BLUT- GALLENSÄUREN.

I. Mitteilung. Kritik der Methode von Aldrich.

VON

KENZO KUSUL.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. S. Tsunoo,
Nagasaki.)

(Eingegangen am 9. Februar 1932)

Die Einführung der van den Berghschen Bilirubinbestimmungsmethode in die Klinik (1918) brachte einen grossen Fortschritt auf dem Gebiete der Bilirubinforschung. Wenn man aber nicht die Bilirubinbildung allein, sondern den Ikterus als solchen in Betracht ziehen will, so muss man ausser dem Gallenfarbstoff auch die Gallensäuren im Blut berücksichtigen. Damit betritt man ein schwieriges Arbeitsgebiet, da zur Zeit eine in der Praxis leicht ausführbare, und doch zuverlässige Bestimmungsmethode der Blutgallensäuren nicht zur Verfügung steht. Eine solche ausfindig zu machen, muss also als unentbehrliche Voraussetzung für die Lösung des Ikterusproblems betrachtet werden. Auch die Frage nach dem "ictère dissocié" kann erst dann aufgeklärt werden.

E. Herzfeld und A. Haemmerli (1924, 1925) wendeten die Pettenkofer'sche Probe in modifizierter Form zur Bestimmung der Blutgallensäuren an. Nach F. Rosenthal und L. Wislicki (1926) ist diese Probe jedoch für die Blutgallensäuren nicht brauchbar. Im Jahre 1928 haben Martha Aldrich und Mary Sue Bledsoe eine quantitative Bestimmungsmethode der Blutgallensäuren, welche auch auf einer modifizierten Pettenkofer'schen Probe beruht, mit Erfolg veröffentlicht. Im folgenden Jahre hat Marie Charlet (1929) diese Methode einer genauen Prüfung unterzogen und mit einigen Veränderungen als brauchbar angenommen.

Da ich mir der grossen Wichtigkeit vollkommen bewusst bin, die der Frage, ob die Aldrichsche Methode wirklich eine zuverlässige sei, zukommt, so folgte ich gern der Anregung von Herrn Prof. S. Tsunoo, diese Methode einer Kritik zu unterziehen.

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

II. Gallensäuregehalt im normalen Menschenblut nach Aldrichscher Methode.

Bei meinen Untersuchungen beschäftigte ich mich zuerst damit, zu sehen, wie gross sich der Gallensäuregehalt im normalen Menschenblut nach der Aldrichschen Methode erweist. Dabei ist es nicht überflüssig, diese Methode hier kurz zu beschreiben, da auch meine weiteren Ausführungen dadurch leichter verstanden werden können. 5,0 ccm mit Oxalat behandeltes Blut werden unter Schütteln in einem Messkolben von 50,0 ccm Inhalt zu 35,0 ccm 95%igem Alkohol zugefügt; dann füllt man mit Alkohol auf und filtriert. 35,0 ccm des leicht gefärbten Filtrates werden mit ungefähr 40 bis 50 mg Norit versetzt, gut geschüttelt und wieder filtriert. Das Filtrat muss klar und farblos sein. 30,0 ccm dieses Filtrates werden in ein 100 ccm haltiges Becherglas hineingetan und mit 1,0 ccm einer gesättigten Lösung von Bariumhydroxyd versetzt; das Gemisch wird auf einer elektrischen Heizplatte schnell auf 3 bis 4 ccm eingedampft. Das endgültige Trocknen führt man am besten mit einem elektrischen Fächer aus. Um Cholesterin und Fette zu entfernen, wird nun der sorgfältig getrocknete Rückstand dreimal mit je 5,0 ccm wasserfreiem Äther, der auf der Heizplatte zum Sieden gebracht wird, extrahiert. Losgelöste Partikelchen des Rückstandes können durch Zentrifugieren der ätherischen Lösung zurückgewonnen werden.

Als Standard wird umkrystallisierte Glykocholsäure gebraucht. Die 0,1%ige alkoholische Stammlösung wird mit Alkohol 10fach verdünnt, so dass die Standardlösung jetzt in 1,0 ccm 0,1 mg Glykocholsäure enthält. 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 und 4,0 ccm dieser Lösung werden in fünf 100 ccm haltige Bechergläser gebracht und mit dem elektrischen Fächer getrocknet.

Zu der getrockneten, zu untersuchenden Probe und zu jedem Standard setzt man 0,4 ccm einer 1%igen Rohrzuckerlösung und 8,0 ccm von 60 volum-%iger Schwefelsäure zu. Die Becher werden dann 1 Stunde lang in einen Ofen von ca. 37°C gestellt. Während dieser Zeit entwickelt sich in den Lösungen eine rosa Farbe. Die Lösungen werden nun einige Minuten in einem Eiskasten abgekühlt, um die weitere Farbentwicklung zu verhindern. Während der ganzen Prozedur werden die zu untersuchende Probe und die Standardlösungen, was Belichtung und Erwärmen betrifft, vollkommen gleich behandelt. Der Bariumsulfatniederschlag in der zu untersuchenden Lösung wird 15 Minuten lang sehr rasch zentrifugiert, und die darüberstehende Flüssigkeit mit einer möglichst farbgleichen Vergleichslösung verglichen. Die Standardlösung steht auf 15 mm. Dann ergibt sich aus der folgenden Formel der Gallensäuregehalt, in mg Glykocholsäure für 100,0 ccm Blut ausgedrückt (a).

$$a = \frac{15}{x} \cdot b \cdot \frac{100}{3}$$

b: Menge der Glykocholsäure in der Standardlösung in mg.

x: Ablesung der unbekannten Lösung.

Als Untersuchungsmaterial wählte ich ausser gesunden Menschen auch solche Patienten, die praktisch als lebergesund betrachtet werden konnten. Die Blutentnahme wurde immer im nüchternen Zustand ausgeführt. Die Resultate wurden in Tabelle I zusammengestellt.

Aus der Tabelle ergibt sich, dass der Blutgallensäuregehalt im normalen Zustand nach meiner Bestimmung 3,49mg% im Mittel beträgt, indem die einzelnen Werte zwischen 2,56 und 5,26 mg% schwanken. Diese Resultate stimmen mit denen von Aldrich gut überein, da nach ihm der Gallensäuregehalt im Blut zwischen 3,2 und 5,1 mg% schwankt. Ob dieser Wert der wirklichen Menge der Blutgallensäuren entspricht, musste nun weiter untersucht werden.

TABELLE I.

Datum (1931)	Geschlecht	Alter	Name	Diagnose	Gallen- säuren in mg%
22. Juli	Männl.	28.	M. Yamaguchi.	Psoasabscess (?).	4,47
" "	"	22.	M. Shiota.	Chron. Nephritis mit nephrot. Einschlag.	2,77
23. "	Weibl.	23.	N. Tanaka.	Pleuritis exsudativa sinistra.	2,95
" "	"	46.	Y. Sueyoshi.	Gallensteinkrankheit (Pause).	4,00
27. "	Männl.	24.	H. Tagawa.	gesund.	3,57
1. Aug.	Weibl.	21.	Y. Tanaka.	gesund.	3,57
" "	"	26.	R. Kinoshita.	gesund.	2,94
5. "	"	51.	Y. Yuasa.	Splanchnoptose.	5,26
7. "	"	38.	H. Katsuki.	Aerophagie.	5,26
" "	"	20.	C. Hichijo.	gesund.	5,00
8. "	Männl.	25.	S. Noma.	gesund.	3,45
" "	"	39.	K. Narabayashi.	Pneumonia crouposa (Rekonvaleszenz).	3,45
13. "	"	22.	N. Iwasaki.	Lungentuberkulose.	3,12
2. Sept.	"	27.	K. Fukai.	" "	4,16
" "	"	65.	H. Niwa.	Diabetes mellitus.	4,35
" "	Weibl.	23.	A. Hashimoto.	gesund.	3,70
3. "	Männl.	23.	K. Kato.	Lungentuberkulose.	3,22
12. "	Weibl.	19.	S. Nakamura.	gesund.	3,03
" "	"	18.	T. Matsushita.	"	3,12
17. "	"	18.	H. Iwanaga.	"	3,14
" "	Männl.	22.	M. Nakamura.	Beriberi.	3,04
18. "	"	39.	K. Norimoto.	Rekonvaleszenz des Typhus abdominalis.	3,22
19. "	Weibl.	23.	A. Yokota.	gesund.	2,56
3. Okt.	"	17.	H. Hashiguchi.	"	2,62
4. "	"	20.	M. Tashiro.	"	2,56
" "	"	20.	T. Kosaki.	"	2,56
7. "	"	50.	Y. Takeuchi.	Hochdruckkrankheit.	3,12
Durchschnittswert.					3,49

II. Beziehung zwischen dem Farbenton und der Gallensäurenmenge der Standardlösungen.

Eine Reihe von Vergleichslösungen wurde, wie oben beschrie-

ben, hergestellt. Die Lösungen enthielten 0,10, 0,15, 0,20, 0,30 resp. 0,40 mg Glykocholsäure. Ausserdem wurde noch eine Lösung, die keine Glykocholsäure enthielt, als Kontrolle hergestellt. Die Lösungen, die alle *ceteris paribus* ganz gleich behandelt wurden, ergaben je nach dem Gallensäuregehalt die folgenden Farbtöne, obgleich es sehr schwer ist, die Farben exakt zu beschreiben:

0 Ein schönes Gelb.
 0,10 mg Gelb, mit leicht bräunlichrotem Ton.
 0,15 mg Gelborange, mit bräunlichrotem Ton.
 0,20 mg Rosarot mit Orangefarbbenton (typisch).
 0,30 mg Helles Rosarot.
 0,40 mg Dunkles Rosarot.

Diese gefärbten Lösungen wurden nun der Reihe nach gegeneinander kolorimetrisch verglichen.

Die Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt.

TABELLE II.

		Glykocholsäuremenge in Standardlösung in mg. Die Skala steht immer auf 15 mm.									
		0,10		0,15		0,20		0,30		0,40	
		Theor. Skala mm	Exper. Skala mm	Theor. Skala mm	Exper. Skala mm	Theor. Skala mm	Exper. Skala mm	Theor. Skala mm	Exper. Skala mm	Theor. Skala mm	Exper. Skala mm
Glykocholsäuremenge in den zu untersuchenden Lösungen in mg	0,10	15,0	15,3 15,1 15,0	22,5	22,8 22,0 22,3						
	0,15			15,0	15,4 15,0 15,2	20,0	20,3 20,5 20,0				
	0,20					15,0	15,0 14,8 15,0	22,5	22,9 22,2 22,3		
	0,30							15,0	15,4 15,0 14,8	20,0	19,7 20,2 20,0
	0,40									15,0	15,0 14,9

Aus dieser Tabelle stellt sich heraus, dass die Intensität der

Farben, die sich durch Zusatz von Rohrzucker und Schwefelsäure zu Glykocholsäure entwickeln, sich innerhalb der Grenzen 0,10 und 0,40 mg der Gallensäuremenge proportional verändert. Diese Feststellung wurde nun als Grundlage der weiteren Untersuchungen benutzt.

III. Adsorption der Glykocholsäure an Norit.

Je 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 und 6,0 ccm einer 0,01%igen alkoholischen Glykocholsäurelösung wurden unter Schütteln in einem Messkolben von 50,0 ccm Inhalt zu 35,0 ccm 95%igem Alkohol zugefügt und dann mit Alkohol aufgefüllt. Diese alkoholischen Lösungen wurden mit etwa 50 mg genau abgewogenem Norit versetzt, gut geschüttelt und dann filtriert. 30,0 ccm des Filtrates wurden eingedampft. Der Rückstand wurde mit 0,4 ccm 1%iger Rohrzuckerlösung und 8,0 ccm 60 volum-%iger Schwefelsäure versetzt, dann 1 Stunde in einem Ofen bei 37°C gehalten. Nach einige Minuten langer Abkühlung der Lösungen im Eisschrank wurde jede zu untersuchende Lösung gegen die Standardfarbe, die ihr in der Farbenintensität am nächsten stand, kolorimetrisch verglichen. Die Resultate wurden in Tabelle IIIa zusammengestellt. Die Menge

TABELLE III a.

Versuchs- nummer	Ursprüngl. Menge der Glykochol- säure in 50,0 ccm alkohol. Lösung in mg	Menge des Norits in mg	Wiedergefundene Menge im Filtrat		Verlorene Menge		Zimmer- temperatur
			mg pro 50,0 ccm	Konzen- tration in mg% (C)	Glykochol- säure im ganzen in mg	pro 50 mg Norit berechnet (a)	
1.	0,200	51,6	0,117	0,234	0,083	0,080	31,0°C
	0,300	49,4	0,202	0,404	0,098	0,099	
	0,400	48,4	0,288	0,576	0,112	0,115	
	0,500	48,2	0,375	0,750	0,125	0,129	
	0,600	50,2	0,459	0,918	0,141	0,140	
2.	0,200	50,2	0,119	0,238	0,081	0,080	31,5°C
	0,300	49,2	0,203	0,406	0,097	0,098	
	0,400	48,0	0,290	0,580	0,110	0,114	
	0,500	48,0	0,378	0,756	0,122	0,127	
	0,600	48,6	0,462	0,924	0,138	0,142	

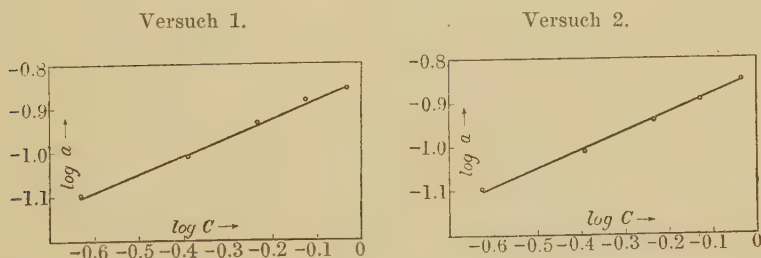
der nach Behandlung mit Norit wiedergefundenen Glykocholsäure ist auch in mg% (C) angegeben. Angenommen, dass die verlorene Glykocholsäuremenge an Norit adsorbiert worden wäre, rechnen wir die verlorene Menge in die an 50,0 mg Norit adsorbierte um, die in mg(a) angegeben wird. In Tabelle IIIb werden $\log C$ und $\log a$ zusammengestellt. Tragen wir die logarithmierten Werte in ein Koordinatensystem ein, so erhalten wir Fig. 1.

Dass die Kurven nahezu geradlinig verlaufen, erinnert uns an die Freundlichsche Adsorptionsisotherme. Meine Annahme, dass die Glykocholsäure an Norit adsorbiert werden kann, muss also als richtig angesehen werden.

TABELLE III b.

Versuch 1.		Versuch 2.	
$\log C$	$\log a$	$\log C$	$\log a$
-0,631	-1,097	-0,624	-1,097
-0,394	-1,004	-0,392	-1,009
-0,239	-0,939	-0,237	-0,943
-0,125	-0,889	-0,122	-0,896
-0,037	-0,854	-0,035	-0,848

Fig. 1.



IV. Adsorption der Glykocholsäure an Bariumsulfat.

2,0, 3,0, 4,0, 5,0 und 6,0 ccm der 0,01%igen alkoholischen Glykocholsäurelösung wurden unter Schütteln in einem Messkolben von 50,0 ccm Inhalt zu 35,0 ccm 95%igem Alkohol zugefügt und dann mit Alkohol aufgefüllt. Diese alkoholischen Lösungen wurden mit

1,0 ccm konzentrierter Bariumhydroxydlösung versetzt, und das Gemisch, wie oben erwähnt, eingedampft. Der getrocknete Rückstand wurde mit 0,4 ccm 1%iger Rohrzuckerlösung und 8,0 ccm einer 60 volum-%igen Schwefelsäure versetzt und in einem Ofen von 37°C 1 Stunde lang gehalten. Die weitere Prozedur wurde auf oben genannte Weise ausgeführt, und die Glykocholsäuremenge in den zu untersuchenden Lösungen bestimmt.

Die Resultate werden in Tabelle IVa zusammengestellt. Um diese Tabelle zu verstehen, sind einige Bemerkungen nötig: Wenn die Glykocholsäure an Bariumsulfat adsorbiert würde, muss dieser Prozess in dem obengenannten Gemisch zustande kommen. In der Tabelle bezieht sich die Menge von Glykocholsäure auf das Volumen dieses Gemisches, das ungefähr, wenn auch nicht exakt, durch die Summe der Rohrzuckerlösung (0,4 ccm) und der Schwefelsäure (8,0 ccm) ausgedrückt werden kann. Die Menge des Bariumsulfats, das aus 1,0 ccm der gesättigten Bariumhydroxydlösung und einer äquivalenten Menge Schwefelsäure entsteht, darf bei allen Proben als dieselbe betrachtet werden.

TABELLE IV a.

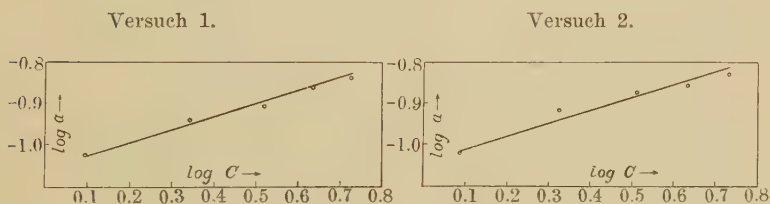
Versuchs- nummer	Ursprüngl. Menge der Glykochol- säure in 8,4 ccm H ₂ SO ₄ - Lösung in mg	Menge des Ba(OH) ₂ in ccm	Wiedergefundene Menge im Zentrifugat		Verlorene Menge (als an BaSO ₄ adsorbiert betrachtet) in mg (a)	Zimmer- temperatur
			mg pro 8,4 ccm	Konzen- tration in mg% (C)		
1.	0,200	1,0	0,105	1,250	0,095	30,5°C
	0,300	1,0	0,185	2,202	0,115	
	0,400	1,0	0,277	3,297	0,123	
	0,500	1,0	0,363	4,321	0,137	
	0,600	1,0	0,457	5,440	0,143	
2.	0,200	1,0	0,102	1,213	0,098	31,0°C
	0,300	1,0	0,178	2,119	0,122	
	0,400	1,0	0,268	3,190	0,132	
	0,500	1,0	0,362	4,309	0,138	
	0,600	1,0	0,452	5,381	0,148	

Nun gibt man die Konzentration(C) der wiedergefundenen Glykocholsäure in mg% an und nimmt an, dass die verlorene Glykocholsäuremenge an das Bariumsulfat adsorbiert worden wäre. Diese adsorbierte Menge wird in mg(a) ausgedrückt. In Tabelle IVb werden die logarithmierten Werte von C und a zusammengestellt. Tragen wir diese Werte in ein Koordinatensystem ein, so erhalten wir Fig. 2.

TABELLE IV b.

Versuch 1.		Versuch 2.	
$\log C$	$\log a$	$\log C$	$\log a$
0,097	-1,022	0,084	-1,019
0,343	-0,939	0,326	-0,914
0,518	-0,910	0,504	-0,879
0,636	-0,863	0,634	-0,860
0,736	-0,845	0,731	-0,830

Fig. 2.



Die Kurven verlaufen hier wieder nahezu geradlinig und entsprechen der Freundlich'schen Adsorptionsisotherme. Aus diesem Versuche geht hervor, dass wirklich Adsorption zwischen der Glykocholsäure und dem Bariumsulfat besteht. Dabei bleibt es dahingestellt, ob die Glykocholsäure selbst oder der nach Rohrzucker- und Schwefelsäurezusatz entwickelte Farbstoff an das Bariumsulfat adsorbiert wird.

V. Ein wie grosser Teil der Glykocholsäurelösungen von verschiedenen Konzentrationen wird bei vollständiger Durchführung der Aldrichschen Prozedur wiedergefunden?

5,0, 6,0, 8,0, 9,0 und 10,0 ccm einer 0,01%igen alkoholischen Glykocholsäurelösung wurden unter Schütteln in einem Messkolben von 50,0 ccm Inhalt zu 35,0 ccm 95%igem Alkohol zugefügt, dann mit Alkohol aufgefüllt und filtriert. An jedem Filtrat wurde die vollständige Prozedur von Aldrich vorschriftsmässig ausgeführt.

Die Resultate sind in Tabelle V zusammengestellt.

TABELLE V.

Ursprüngl. Menge der Glykocholsäure in 50,0 ccm alkoholischer Lösung in mg	Zurückgebliebene Glykocholsäure- menge pro 50,0 ccm Lösung umgerechnet. in mg		
0,500	0,175	0,170	0,172
0,600	0,252	0,242	0,247
0,800	0,343	0,347	0,352
0,900	0,432	0,430	0,428
0,100	0,517	0,520	0,515
Versuchsnummer	1.	2.	3.
Zimmertemperatur	27,3°C	27,0°C	27,5°C

Aus dieser Tabelle ersieht man, dass von den Glykocholsäurelösungen eine ziemlich grosse Menge dieser Substanz durch die Aldrichsche Methode verloren geht. Dabei muss die Adsorption an Norit und Bariumsulfat die Hauptrolle spielen.

VI. Zusatzversuche.

Bis hierher beschäftigte ich mich mit den alkoholischen Glykocholsäurelösungen. Aber es ist auch sehr wichtig zu sehen, eine wie grosse Menge von der dem Blut zugesetzten Glykocholsäure durch die Aldrichsche Methode wiedergefunden werden kann. Da aber die Glykocholsäure selbst nicht im Wasser löslich ist, musste ich als Zusatzmaterial Natriumglykocolat benutzen. Mir

stand dabei nur das Mereksche Präparat zur Verfügung, das chemisch nicht ganz rein ist, sodass man zuerst den Gehalt dieses Präparates an Glykocholsäure bestimmen musste, was folgendermassen ausgeführt wurde:

5,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurden mit 1,0 ccm einer Glykocholatlösung versetzt, deren Konzentration zwischen 0,05 und 0,10% schwankte. Von diesem Gemisch wurden 5,0 ccm abpipettiert und auf einer elektrischen Heizplatte zum Trocknen eingedampft. Der Rückstand wurde bald direkt, bald nach 3-maliger Extraktion mit je 5 ccm Äther nach Aldrich mit Rohrzuckerlösung und Schwefelsäure versetzt, und dann kolorimetrisch untersucht. Beide Manipulationen gaben fast gleiche Werte. Auf solche Weise wurde die Menge der Glykocholsäure, die bei Zusatzversuchen dem Blut zugesetzt wurde, genau festgestellt.

Ein Beispiel solcher Eichungsversuche wird in Tabelle VI angegeben.

TABELLE VI.

Konzentration der Natrium- glykocholat- lösungen %	Gefundene Menge der Glykocholsäure pro 1,0 ccm Natriumglykocholatlösung	
	Ohne Ätherextraktion mg	Nach Ätherextraktion mg
0,05	0,349	0,342
0,07	0,503	0,486
0,10	0,706	0,727

Nun kommen die Zusatzversuche in Betracht. 5,0 ccm mit Oxalat behandeltes Blut wurden mit einer bestimmten Menge von Natriumglykocholat versetzt, das in physiologischer Kochsalzlösung gelöst war. Davon wurden 5,0 ccm aufgenommen und unter Schütteln in einem Messkolben von 50,0 ccm Inhalt zu 35,0 ccm 95%igem Alkohol zugesetzt. Die weitere Behandlung wurde genau nach Aldrich ausgeführt. Als Kontrollversuche wurde 5,0 ccm mit Oxalat behandeltes Blut mit derselben Menge physiologischer Kochsalzlösung, die kein Glykocholat enthielt, versetzt und weiter in ganz gleicher Weise behandelt.

Die Resultate werden in Tabelle VII zusammengestellt.

TABELLE VII.

Versuchsnummer	Gallensäuren in Kontrollversuchen (a) mg	Zugesetzte Menge der Glykocholsäure (b) mg	Erwartete Menge der Gallensäuren (a + b) mg	Gefundene Menge der Gallensäuren (aus a + b) mg	Verlorene Menge der Glykocholsäure	
					mg	%
1.	0,166	0,291	0,457	0,277	0,180	39,3
		0,419	0,585	0,352	0,233	39,8
		0,588	0,754	0,500	0,254	33,7
2	0,171	0,285	0,456	0,279	0,177	38,8
		0,405	0,576	0,357	0,219	38,0
		0,606	0,777	0,526	0,251	32,3
3.	0,154	0,808	0,962	0,704	0,258	26,8
				0,709	0,253	26,3

Aus diesen Versuchen stellt sich heraus, dass auch die zum Blut zugesetzte Gallensäure einen grossen Verlust erleidet.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Der Gallensäuregehalt im normalen Menschenblut, der nach Aldrich und Bledsoe bestimmt wird, beträgt 2,56–5,26 mg%.

2. Die Farben der Standardlösungen verändern sich innerhalb der Grenzen 0,1 und 0,4 mg proportional der Glykocholsäuremenge.

3. Die Adsorptionerscheinung wird nicht nur beim Behandeln der Glykocholsäurelösung mit Norit, sondern auch mit Bariumhydroxyd beobachtet. Es bleibt aber beim letzten Fall dahingestellt, ob die Glykocholsäure selbst oder der nach Rohrzucker- und Schwefelsäurezusatz entwickelte Farbstoff an das Bariumsulfat adsorbiert wird.

4. Von den alkoholischen Glykocholsäurelösungen verliert sich eine ziemlich grosse Menge bei vollständiger Durchführung der Prozedur nach der Aldrichschen Methode.

5. Das zum Blute zugesetzte Glykocholat erleidet durch die Aldrichsche Prozedur gleichfalls einen Verlust.

Aus diesen Versuchsergebnissen kann man schliessen, dass der unter 1) genannte Gallensäurenwert im Blut nur einem gewissen Teil der wahren Blutgallensäurenmenge entspricht. Folglich ist die Aldrichsche Methode in ihrer originalen Form nicht mehr für die Praxis tauglich.

Weitere Untersuchungen über die Verbesserung der Aldrichschen Methode bzw. eine neue in der Praxis leicht brauchbare Bestimmungsmethode der Blutgallensäuren sind im hiesigen Laboratorium im Gang.

LITERATUR.

- Aldrich, M. und Bledsoe, S. (1928): J. of biol. Chem., **77**, 519.
 Charlet, M. (1929): Biochem. Z., **210**, 42.
 Herzfeld, E. und Haemmerli, A. (1924, 1925): Schweiz. med. W., **54**, 141; **55**, 142, 164.
 Rosenthal, F. und Wislicki, L. (1926): Archiv. exper. Pathol. und Pharmakol., **117**, 8.
 van den Bergh, A. A. H. (1918): Der Gallenfarbstoff im Blute, Leiden.

ÜBER DIE GALLENSÄUREN-BESTIMMUNG IM URIN DURCH STALAGMOMETRIE.

VON

M. TAKEDA, T. OHO UND T. YOSHINARE.

*(Aus dem biochemischen Laboratorium des Präfektur-Krankenhauses
zu Kobe.)*

(Eingegangen am 12. Februar 1932.)

I. EINLEITUNG.

Die gegenwärtig am meisten gebrauchten Methoden zur Bestimmung der Gallensäuren im Urin sind etwa folgende:

1.) Die Methode von Lepehne (1922), Ignatowsky (1922), u. a., welche prinzipiell darin besteht, dass man unter Benutzung der ausserordentlich starken Kapillaraktivität der Gallensäuren die Oberflächenspannung des Urins bestimmt. 2.) Die Methode von Schmidt und Merrill (1923) oder die von Rosenthal und Wislicki (1926), bei denen man so verfährt, dass man die Aminogruppen des Gallensäurenmoleküls durch Hydrolyse in Freiheit setzt und den freigewordenen Amino-Stickstoff gasometrisch bestimmt, um dann das quantitative Verhältnis der Gallensäuren im Urin festzustellen. 3.) Die Methode von Herzfeld und Haemmerli (1924) sowie die Methode nach Ise (1931), bei denen man sich die Farbenreaktion der Gallensäuren zunutze macht.

Andere Methoden als die der Harn-Stalagmometrie sind für klinische Zwecke, um auf einfache Weise und in rascher Folge das Erscheinen der Gallensäuren im Urin nachzuweisen und sie quantitativ zu bestimmen, wegen ihrer Kompliziertheit nicht geeignet.

Auch ist die Bestimmung der Gallensäuren im Urin durch Stalagmometrie technisch am einfachsten. In gewissen pathologischen Harnen befinden sich jedoch ausser diesen Säuren noch andere oberflächenaktive Substanzen, weshalb bei der stalagmometrischen Bestimmung der Harngallensäuren das Bedürfnis

besteht, den Einfluss dieser anderen kapillaraktiven Substanzen erst zu beseitigen.

Bei den bisher publizierten stalagmometrischen Methoden ist jedoch keine Rücksicht auf die Einwirkung solcher Stalagmone genommen worden.

Um die Stalagmometrie, die an und für sich eine leicht handliche Methode und sogar klinischen Verhältnissen besonders angepasst ist, als geeignete Methode zur Bestimmung der Gallensäuren in Urin noch weiter zu vervollkommen, sind wir auf die Frage eingegangen, wie weit man die Einwirkung der anderen Harnstalagmone ausser den Gallensäuren möglicherweise ausschalten kann, und wie man die Methode verbessern oder die Versuchsbedingungen stellen muss. Es ist uns auch gelungen, die uns wesentlich erscheinenden Bedingungen herauszufinden, unter denen die Einwirkung der anderen oberflächenaktiven Substanzen ausser Gallensäuren so gut wie vollständig ausgeschaltet werden kann. Wir haben dann weiter noch sowohl experimentell in Gallensalzlösungen als auch klinisch im ikterischen resp. nicht-ikterischen Harn eingehende Untersuchungen der Versuchsbedingungen vorgenommen, wobei sich ergab, dass man die Gallensäuren im Urin durch Stalagmometrie relativ genau zu bestimmen vermag, wenn man nur diese Bedingungen erfüllt. Wir wollen nun eine kurze Übersicht über die von uns ausgearbeitete Bestimmungsmethode, die damit erzielten Versuchsergebnisse und die klinischen Fälle geben.

II DIE OBERFLÄCHENAKTIVEN SUBSTANZEN AUSSER DEN GALLENSÄUREN.

Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, dass die Gallensäuren eine sehr starke Kapillaraktivität der Lösung bedingen. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Bestimmung der Gallensäuren im Urin unter Benutzung dieses auffallenden Umstandes unschwer möglich wäre. Im Urin finden sich aber ausser Gallensäuren noch andere oberflächenaktive Substanzen vor. Bei der stalagmometrischen Bestimmung der Harn gallensäuren muss man deswegen von vornherein solche Substanzen entweder vollständig beseitigen oder sie oberflächeninaktiv machen. Diese oberflächenaktiven Sub-

stanzen wurden zuerst von Schemensky (1920) beobachtet und später auch von Takeda (1923) bezüglich ihrer Eigenschaften eingehend studiert. Takeda hat nämlich sowohl experimentell als auch klinisch bewiesen, dass diese Substanzen im Harn bei manchen Erkrankungen, insbesondere bei Leber- und Fieberkrankheiten vorkommen. Dabei hat es sich noch herausgestellt, dass ihre Oberflächenaktivität gerade bei einem Harn- PH von etwa 4 am deutlichsten, dagegen bei 9 am geringsten ausgeprägt ist. Es hat sich ferner erwiesen, dass diese Substanzen offenbar zur Urobilinfraktion des Harns gehören.

Ausser den obenerwähnten kapillaraktiven Substanzen, die eigentlich zur Urobilinfraktion gehören, übt noch ein anderer Faktor im Urin einen gewissen Einfluss auf die Oberflächenspannung des Urins aus. Da es sich hauptsächlich um eine Molar-konzentration des Harns handelt, kommt es darauf an, bei der Messung der Oberflächenspannung das spezifische Gewicht des Harns möglichst auf eine bestimmte Höhe einzustellen. Zur Bestimmung der Gallensäuren im Urin muss man deshalb zunächst das spezifische Gewicht des Harns durch Verdünnung auf eine bestimmte Höhe bringen, und dann die besten Bedingungen herausfinden, die geeignet sind, den störenden Einfluss der der Urobilinfraktion angehörenden, oberflächenaktiven Substanzen auszuschalten oder möglichst abzuschwächen. Unter diesen Bedingungen erfolgt dann die Tropfenzählung des Harns. Die Harnstalagmone, die der Urobilinfraktion angehören, verlieren bei einem Harn- PH von 9 ihre Oberflächenaktivität fast völlig, während die Gallensäuren bei dieser Acidität noch immer stark kapillaraktiv wirken können. Gerade diese Acidität gestattet also, eine einwandfreie stalagmometrische Bestimmung der Harn gallensäuren auszuführen. Da die Aktivität der anderen Harnstalagmone ausser den Gallensäuren bei einem Harn- PH von 9 ganz verloren gegangen ist, variiert die Tropfenzahl bei $\text{PH}=4$ und 9 natürlich sehr stark. Wie verhalten sich nun die Gallensäuren in diesem Fall? Von noch grösserer Bedeutung ist es festzustellen, ob und wie sehr die Oberflächenspannung der Gallensäuren durch eine Verschiebung des Harn- PH -Wertes beeinflusst werden kann.

III. VERHÄLTNIS DER ACIDITÄT ZUR OBERFLÄCHEN- SPANNUNG DER GALLENSÄUREN.

Zuerst wird die Tropfenzahl von taurocholsauren Natriumlösungen verschiedener Konzentration mittels Stalagmometer nach Traube gemessen. Das Resultat findet sich in folgenden Tabellen:

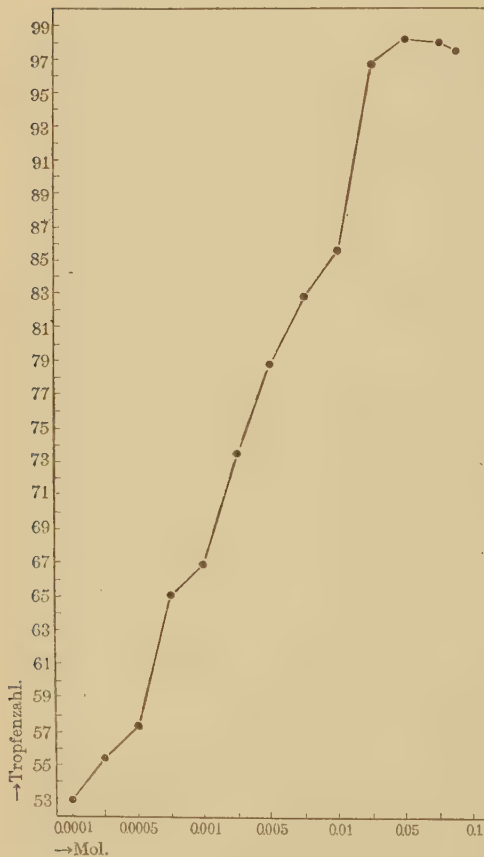


TABELLE I.
Tropfenzahl der Natrium
taurocholatlösungen
verschiedener
Konzentration.

Mol.	Tropfenzahl
1.0	97.6
0.075	98.0
0.05	98.2
0.025	96.7
0.01	85.6
0.0075	82.7
0.005	78.6
0.0025	73.6
0.001	67.0
0.00075	65.3
0.0005	57.6
0.00025	55.5
0.0001	53.0

Tropfenzahl des Wassers
= 51.8

Fig. 1.

Aus der tabellarischen Zusammenstellung ergibt sich, dass die Gallensalze selbst in niedrigster Konzentration noch eine deutliche Oberflächenspannung bedingen können, die aber, etwa mit der

TABELLE II.
Tropfenzahl der Natrium-
glykocholatlösungen
verschiedener
Konzentration.

Mol.	Tropfenzahl
0.1	87.5
0.05	88.0
0.025	90.6
0.0125	95.1
0.0063	92.0
0.0032	75.1
0.0016	65.2
0.0008	61.0
0.0004	55.3
0.0002	53.8
0.0001	52.0

Tropfenzahl des Wassers
= 51.4

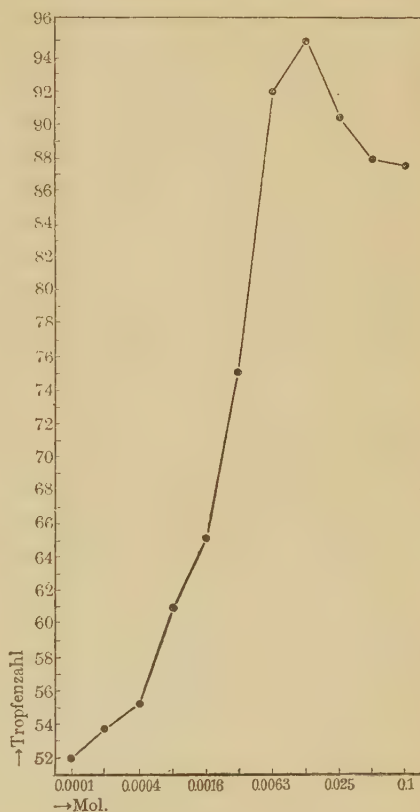


Fig. 2.

Steigerung der Konzentration parallelgehend, verringert wird. Dementsprechend nimmt die Tropfenzahl auch zu. Die abnehmende Oberflächenspannung erreicht bei einer bestimmten Konzentration ihren grössten Wert, und zwar 0.05 Mol für Taurocholatlösung und 0.0125 Mol für Glykocholatlösung. In den noch weiterzunehmenden Konzentrationen verringert sich die Oberflächenspannung aber nicht mehr, sondern sie erhöht sich sogar wieder etwas.

Um den Einfluss des Säuregrades auf die Kapillaraktivität von Gallensalzlösungen festzustellen, wird die Oberflächenspannung der Natriumtaurocholatlösungen verschiedener Konzentration bei ver-

schiedener Acidität gemessen. Die Resultate sind in folgender Tabelle wiedergegeben:

TABELLE III.

Einfluss der Acidität auf die Oberflächenspannung der Natriumtaurocholatlösungen verschiedener Konzentration.

Konz (mol)	0.01	0.008	0.005	0.002	0.001	0.0005	0.00025
P _H							
4.4	104.0	95.2	82.5	75.5	70.3	66.9	62.3
4.5	103.3	94.0	82.7	75.3	70.2	66.0	62.1
5.0	101.5	93.5	92.5	74.9	69.5	65.0	61.1
5.5	93.7	91.0	81.5	72.9	67.6	63.0	58.8
6.0	93.3	90.4	81.3	72.3	66.0	61.8	57.8
6.5	92.5	90.3	81.9	70.8	64.1	60.0	56.0
7.0	89.6	89.3	82.4	73.0	65.6	60.7	56.5
7.5	87.8	87.0	84.3	72.5	65.5	59.9	55.9
8.0	85.8	85.3	80.2	70.0	62.8	58.4	54.7
8.5	81.9	82.0	80.1	69.6	63.0	58.2	54.6
9.0	91.0	81.0	79.5	70.5	64.6	58.8	55.8

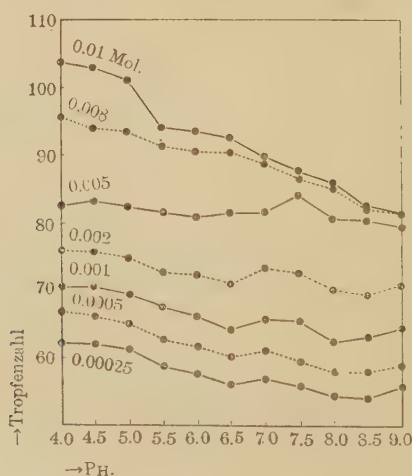


Fig. 3.

Es ergibt sich, dass der Einfluss des P_H-Wertes auf die Oberflächenspannung der Natriumtaurocholatlösungen verschiedener

Konzentration umso stärker ist, je höher die Konzentration ist, und umgekehrt. Ferner wird festgestellt, dass die Tropfenzahl der Lösungen von so geringen Mengen der Gallensalze, wie sie durch den Harn ausgeschieden werden, durch die Acidität kaum beeinflusst wird. Je stärker also die Lösung verdünnt ist, desto kleiner wird der Unterschied der Tropfenzahl bei einem P_H -Wert von 4 und 9.

Es wurde weiter noch ein Versuch vorgenommen, um zu erfahren, wieweit die im Urin befindlichen Gallensalze durch das P_H beeinflusst werden: Unter Heranziehung eines Harns, dessen spezifisches Gewicht von vornherein auf einen bestimmten Wert gebracht wurde, werden Natriumtaurocholatlösungen verschiedener Konzentration hergestellt. Die Tropfenzahl dieser Harnlösungen wird sowohl bei einem P_H -Wert von 9 wie auch von 7 und 4 einzeln gemessen, und die Veränderung der Tropfenzahl bei der Verschiebung des P_H -Wertes genau beobachtet. Die Resultate finden sich in der Tabelle IV:

TABELLE IV.

Tropfenzahl der Natriumtaurocholatlösungen im Urin bei verschiedener Acidität.

P_H g/dl	$P_H=4$	$P_H=7$	$P_H=9$
2.5000	92.0	84.0	78.5
1.2500	96.0	85.0	78.6
0.8333	96.1	87.0	79.0
0.6250	94.5	87.1	79.7
0.4166	89.0	86.7	81.0
0.3125	84.2	82.1	79.0
0.2082	79.0	76.3	75.8
0.1562	76.0	73.6	73.6
0.1041	73.5	70.3	69.8
0.0781	71.8	68.3	67.5
0.0520	69.0	65.4	64.5
0.0390	67.0	64.0	62.3
0.0260	64.5	61.2	60.0
0.0195	63.0	60.0	58.3
0.0130	61.0	58.0	56.5
0.0097	59.6	57.0	54.7
0.0065	58.0	55.0	53.8
0.0048	57.1	54.2	53.3
0.	53.2	51.6	51.3

Um die Harnacidität nun auf einen bestimmten Wert zu bringen, wird der Harn unter Zugabe von Phenolphthalein, Bromthymolblau und Methylorange als Endanzeiger mit N/10 NaOH resp. N/10 HCl genau titriert. Die Harn-Acidität wird durch Zusatz von x NaOH resp. x HCl auf die erforderliche Stärke gebracht, und daraufhin die Messung der Tropfenzahl vorgenommen.

IV. METHODISCHES UND KLINISCHES.

Wie aus obigen Resultaten erhellt, ist die sonst mit der Verschiebung des PH-Wertes parallellgehende Änderung der Tropfenzahl der so stark verdünnten Lösungen von Gallensäuren, wie sie im Harn vorkommen, recht gering, die Differenz bei Harnlösungen der Gallensalze aber jedenfalls bei einem PH-Wert von 9 und 4 wesentlich.

Wie bereits erwähnt wurde, und wie auch die folgenden klinischen Fälle deutlich zeigen, verlieren Harnstalagmone im nicht-ikterischen, pathologischen Harn bei einem PH-Wert 9 schon ihre Kapillaraktivität fast vollständig.

Das Auftreten und Mengenverhältnis der Gallensäuren im Harn lässt sich deshalb durch Tropfenzählung bei einer bestimmten Harn-Acidität, und zwar bei einem PH-Wert von 9 ziemlich genau feststellen. Bei dieser Acidität ist aber der Einfluss anderer kapillaraktiver Substanzen ausser den Gallensäuren fast vollständig ausgeschaltet.

Ausführung: Der Harn wird abfiltriert, das spezifische Gewicht wird genau auf 1.010 und die Acidität auf einen PH-Wert von 9 gebracht. Darauf folgt die Tropfenzählung. Das erzielte Resultat wird zweckmässig mit "Alkaliquotient" (A.Q.) bezeichnet, der bei einem Harn-PH-Wert von 9 durch Stalagmometrie nach der Formel:

$$A.Q. = \left(\frac{St.UA}{St.Wt^o} - 1 \right) \times 1000$$

berechnet wird, wobei A.Q. Alkaliquotient, St.UA Tropfenzahl bei einem Harn-PH-Wert von 9 und St.Wt° Tropfenzahl des destil-

lierten Wassers bei Zimmertemperatur während der Messung bedeuten.

Zum Vergleich wird noch die Tropfenzahl des Harns bei einem Pit-Wert von 7 und 4 zweckmässig mit "Neutralquotient" (*N.Q.*) resp. "Säurequotient" (*S.Q.*) bezeichnet. Jeder Quotient wurde ähnlich wie der "Alkaliquotient" errechnet und im folgenden klinischen Teil angegeben.

Um den zu untersuchenden Harn auf eine bestimmte Acidität zu bringen, wird die Harnacidität unter Zugabe von Phenolphthalein für *A.Q.*, Bromthymolblau für *N.Q.* und Methylorange für *S.Q.* mit $N/10$ NaOH oder $N/10$ HCl titriert, und damit die erforderliche Säure-resp. Alkalimenge errechnet.

Um eine bestimmte Acidität zu erhalten, wird dem Harn eine Menge von N NaOH resp. N HCl, welche der zum Titrieren gebrauchten Menge von $N/10$ NaOH resp. $N/10$ HCl entspricht, zugesetzt. Bei dieser Acidität erfolgt die Tropfenzählung.

Klinisches: Hierauf haben wir den *A.Q.*-Wert klinisch sowohl im ikterischen als auch im nicht-ikterischen Harn gemessen. Der *A.Q.*-Wert des ikterischen Harns betrug in Fällen, wo Bilirubin nachzuweisen war, immer mehr als 150 (Tabelle V), während er dann, wenn Bilirubin im Harn desselben Kranken wegen Besserung des Krankheitszustandes nicht mehr oder nur noch in Spuren nachzuweisen war, eine allmähliche Verringerung erfuhr und schliesslich zum normalen Wert zurückkehrte, wobei sich aber herausstellte, dass der Wert ausnahmsweise und nur bei einem Fall von Gallensteinen kleiner war, obwohl Bilirubin im Harn noch deutlich nachzuweisen war.

Der *A.Q.*-Wert des nicht-ikterischen Harns war ausnahmslos kleiner als 150, während der *S.Q.*- oder *N.Q.*-Wert oft noch sehr gross war. Infolgedessen war die Differenz zwischen dem *A.Q.*- und *S.Q.*-Wert des nicht-ikterischen Harns wesentlich grösser als beim ikterischen Harn.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Unter Ausnutzung der enorm starken Oberflächenaktivität der Gallensäuren wurde eine praktisch sehr einfach anwendbare

TABELLE V.
Klinische Fälle.

Nr.	Datum.	Name.	Klinische Diagnose.	Harnquotient			Harnbefund.
				S.Q.	N.Q.	A.Q.	
1.		I.T. ♂	Leberkrebs	172	103	69	
		"	"	125	83	37	
2.		M.K. ♀	Gallenstein	193	103	54	
3.		K.F. ♂	Leberzirrhose	323	193	125	U(+)UN(+)
		"	"	366	301	103	U(+)UN(+)
4.		S.H. ♂	Leberzirrhose	230	215	80	
		"	"	234	215	82	E(+)
5.		W.N. ♀	Pneumonie	409	241	135	U(+)UN(+)
6.		A.M. ♀	Peritonitis	318	301	140	
		"	"	316	308	133	
7.		M.K. ♂	Phthisis	237	204	112	U(+)UN(+)
8.		Y.S. ♂	Magenkrebs	215	155	103	
		"	"	144	80	54	
9.		K.N. ♀	Pleuritis	145	86	43	
10.		T.G. ♂	Peritonitis	168	62	39	UN(+)
11.		S.I. ♂	Pneumonie	687	140	58	UN(+)
12.		Y.M. ♂	Diabetes, Urämie	237	131	47	E(+)Z(+) UN(+)
		"	"	211	128	86	E(+)Z(+)
13.		B.M. ♂	Magenkrebs	129	114	88	UN(+)
14.		H.T. ♀	Nephritis chronica	129	71	39	E(+)
15.		K.K. ♂	Peritonitis	187	43	22	
16.		M.K. ♂	Pleuritis exsudativa	212	73	54	U(+)UN(+)
17.		M.T. ♀	Mammakrebs	183	75	54	UN(+)
18.		K.H. ♂	Pneumonie	183	97	86	
		"	"	211	65	45	
19.		N.O. ♀	Urämie Herzinsuffizienz	247	161	121	E(+)
20.		H.T. ♂	Lungen tbc.	279	120	94	UN(+)
21.		Z.U. ♂	Urämie	125	39	26	E(+)
22.		N.Y. ♂	Magenkrebs	237	125	97	UN(+)
23.		K.N. ♂	Leberkrebs	231	131	121	
24.		S.T. ♂	Leberkrebs	228	133	93	
25.		M.K. ♀	Lungen tbc.	207	157	103	UN(+)U(+)

Gallensäuren-Bestimmung im Urin durch Stalagmometrie. 423

26.		H.O. ♂	Lungenbrand	147	93	62	
27.		S.A. ♂	Pneumonie	128	74	66	
28.		Y.K. ♀	Peritonitis	155	41	33	
29.		M.K. ♀	Gallenstein	273	148	80	G(+)
30.		M.T. ♀	Leberabszess	348	323	290	E(+) ⁺ G(+) U(+) ⁺ UN(+)
		"	"	348	316	252	E(+) ⁺ G(+) U(+)
		"	Ikterus katarrhalis	409	392	230	U(+) ⁺ UN(+) G(+)
31.		O.H. ♂	"	327	260	170	N(+) ⁺ G(-)
32.		Y.T. ♂	Ikterus	290	258	174	G(+)
		"	"	297	258	176	G(+)
33.		S.M. ♀	Phosphorvergiftung	387	355	215	E(+) ⁺ UN(+) G(-) ⁺ N(+) UN(+)
		"	"	445	403	217	G(+) ⁺ U(+) UN(+)
34.		S.K. ♂	Gallenstein	355	348	230	N(+) ⁺ G(-)
		"	"	251	230	180	N(+) ⁺ G(-)
		"	"	301	291	204	G(+) ⁺ NU(+)
35.		M.N. ♂	Lebersyphilis	372	359	237	G(+)
		"	"	371	282	211	G(+)
		"	"	344	241	151	G(+)
36.	17/VII	K.M. ♂	Ikterus katarrhalis	325	222	174	G(+) ⁺ U(+) UN(+)
	20/VII	"	"	234	191	153	G(+)
	22/VII	"	"	232	171	154	N(+) ⁺ G(-) UN(+)
	23/VII	"	"	86	58	45	
37.		T.S. ♂	Ikterus katarrhalis	300	188	156	N(+) ⁺ G(-) UN(+)
38.		M.T. ♀	Ikterus katarrhalis	281	203	183	G(+) ⁺ UN(+)
39.		T.M. ♂	Ikterus katarrhalis	284	202	188	G(+) ⁺ U(+)
		"	"	275	172	156	G(+) ⁺ UN(+)
		"	"	300	290	272	UN(+) N(+) ⁺ G(-)
40.		R.S. ♀	Ikterus katarrhalis				
		"	"	235	225	215	UN(+) ⁺ G(+)
41.		G.I. ♂	Ikterus katarrhalis	333	236	200	U(+) ⁺ G(+)
		"	"	324	198	164	U(+) ⁺ G(+)
42.	1/VII	F.H. ♂	Ikterus katarrhalis	322	259	231	G(+)
	2/VII	"	"	345	276	236	G(+)

	4/VII	"	"	382	320	273	U(+) _G (+)
	6/VII	"	"	272	197	174	U(+) _G (+)
	8/VII	"	"	304	199	188	U(+) _{UN} (+) G(+)
	11/VII	"	"	364	234	206	U(+) _G (+)
	14/VII	"	"	363	181	166	N(+) _G (-)
	20/VII	"	"	259	121	109	
	23/VII	"	"	215	113	106	
43.	17/III	M.K. ♂	Weilsche Krankheit	297	201	156	G(+) _{NU} (+)
	19/III	"	"	321	227	182	G(+)
	20/III	"	"	348	254	211	G(+)
	21/III	"	"	230	186	150	G(+) _{UN} (+) G(+)
	22/III	"	"	262	203	190	G(+)
	23/III	"	"	274	211	164	G(+)
44.	12/III	N.H. ♀	Leberkrebs	304	195	162	G(+)
	13/III	"	"	313	211	188	G(+) _{NU} (+)
	15/III	"	"	358	230	205	G(+)
	17/III	"	"	282	185	173	G(+)
	19/III	"	"	332	230	195	G(+) _U (+)
	21/III	"	"	360	234	211	G(+)
	23/III	"	"	379	260	234	G(+) _{UN} (+)
	26/III	"	"	360	230	211	G(+)
	28/III	"	"	260	191	168	G(+)
	30/III	"	"	293	223	201	G(+)
	31/III	"	"	283	195	168	G(+)

E....Eiweiss

Z....Zucker

G....Gmelinsche Probe

UN....Urobilinogen N....Nakayamasche

U....Urobilin

stalagmometrische Bestimmungsmethode dieser Säuren im Harn beschrieben.

Da aber im Harn an sich schon andere oberflächenaktive Substanzen ausser den Gallensäuren vorhanden sind, waren wir zunächst bestrebt, die zur Ausschaltung dieser unerwünschten Beeinflussung geeigneten Versuchsbedingungen herauszufinden. Gestützt auf diese haben wir dann Experimente vorgenommen und sind zu dem Resultat gekommen, dass der Einfluss anderer Harnstalagmone ausser den Gallensäuren, ohne die Oberflächenaktivität

dieser Stoffe irgendwie zu verändern, beseitigt werden kann, unter der Voraussetzung, dass man die Tropfenzählung bei einem bestimmten spezifischen Gewicht und einer bestimmten Acidität des Harns ($P_H=9$) vornimmt.

2. Bezeichnet man die Resultate, die bei einem bestimmten spezifischen Gewicht (1.010) und einer bestimmten Acidität ($P_H=9$) des Harns durch Tropfenzählung erzielt wurden, als Quotient, so beträgt der Quotient-Wert des ikterischen Harns mehr als 150 und der des nicht-ikterischen oder gesunden Harns weniger als 150.

3. Diese neue Methode ist technisch sehr einfach, ermöglicht sogar eine relativ exakte Messung der Gallensäuren im Urin und hat den Vorteil, dass man klinisch auf schnellstem Wege das Erscheinen der Gallensäuren im Urin sowohl wie das Bestehen von Cholämie feststellen kann.

LITERATUR.

- Herzfeld und Haemmerli (1924): Schweiz med. Wochenschr., Nr. 6.
 Ignatowsky (1922): Wien. klin. Wochenschr., Nr. 49.
 Ise (1931): Igakukenkyu, Bd. 5.
 Lepehne (1922): Klin. Wochenschr., Nr. 41.
 Rosenthal und Wislicki (1926): Arch. f. exp. Pathol. und Pharmakol. 117.
 Schemensky (1920): Bioch. Zeitschr., 105.
 Schmidt and Merrill (1923): Journ. of biol. chem., 58.
 Takeda (1923): The journal of biochemistry, 2.

ÜBER EINE MIKROMETHODE ZUR BESTIMMUNG DES WAHREN ZUCKERGEHALTES IM BLUT.

VON

NIROICHI DOI.

*(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Präfektur-Hospitals zu Kobe.
Vorstand: Dr. M. Takeda.)*

(Eingegangen am 12. Februar 1932)

Da sich im Blut ausser Glukose noch andere reduzierende Substanzen befinden, zeigt die Blutzuckermenge, die mit Hilfe der bisherigen Methoden zur Bestimmung des Gesamt-Reduktionsvermögens festzustellen ist, keineswegs den wirklichen wahren Zuckerwert. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes sind wir nun dazu übergegangen, den wahren Zuckerwert des Blutes ausschliesslich auf mikromethodischem Wege festzustellen.

Zur Bestimmung des wahren Zuckers hat man sich bisher an eine Methode gehalten, welche prinzipiell darin besteht, dass man eine solche Substanz zur Bestimmung heranzieht, die im Filtrat des enteiwässerten Blutes spezifisch nur auf Zucker allein, nicht aber auf andere reduzierende Substanzen wirkt, oder man geht umgekehrt so vor, dass man nur den Zucker allein im enteiwässerten Filtrat übrigbleiben lässt und andere reduzierende Substanzen mit dem Bluteiweiss völlig mitentfernt. Bezüglich der letzteren Methode haben im Jahre 1928 amerikanische Forscher wie Edward S. West u. a. (1929) eine Merkurisulfat- sowie Merkurinitratmethode veröffentlicht, die prinzipiell darin besteht, dass man andere reduzierende Substanzen als Zucker durch Merkurisulfat oder Merkurinitrat mitsamt dem Bluteiweiss sich absetzen lässt und erst dann in diesem Filtrat Untersuchungen anstellt, um damit den wahren Zuckerwert quantitativ festzustellen.

Ich selbst habe behufs der Bestimmung des wahren Zuckers einmal diese Methode nachgeprüft, bin aber mit der später von Somogyi (1926) verbesserten und vielfach von den obengenannten Autoren zur Blutzuckerbestimmung herangezogenen Shaffer-

Hartmannschen Zuckerbestimmungsmethode (1921–22) leider zu keinem eindeutigen Resultate gekommen. Nur die Zuckerbestimmungsmethode nach Hagedorn-Jensen hat dabei ein ziemlich konstantes Resultat gezeigt, wobei sich jedoch ergab, dass der wahre Zuckerwert etwa dem nach der Originalmethode von Hagedorn-Jensen festgestellten Zuckerwert gleichkam.

Da bei der Anwendung einer Blutmenge von weniger als 1.0 ccm jedoch eine zur Mikrobestimmung des wahren Zuckers ausreichende Filtratmenge kaum erhältlich war, habe ich auf Anwendung dieser Methode verzichtet. Aus diesem Grunde habe ich erneut Untersuchungen vorgenommen, und zwar mit der Absicht, eine ganz zuverlässige Mikromethode zur Bestimmung des wahren Zucker, mittels alkoholischer Gärung durch Hefe, die spezifisch nur auf Zucker wirkt, herauszufinden.

Bezüglich solcher Hefemethoden liegen bisher schon einige Arbeiten vor (Michael Somogyi, 1927; Nakamura-Oyama, 1928, u.a.). Bei der Zuckerbestimmung nach diesen Methoden ist jedoch eine Blutentnahme in ziemlich grosser Menge unumgänglich, während der gesteigerten Reduktion wegen, die auf zuviel zugesetzte Hefe zurückzuführen ist, diese Methode sehr leicht zu Irrtümern Anlass geben kann. Die Anwendung von zu geringen Hefemengen kann ebenfalls ein ganz unsicheres Resultat bedingen, da die Vollendung der Gärung eine ziemlich lange Zeit in Anspruch nimmt, was natürlich eine Entwicklung der Saprophyten in den Medien begünstigt.

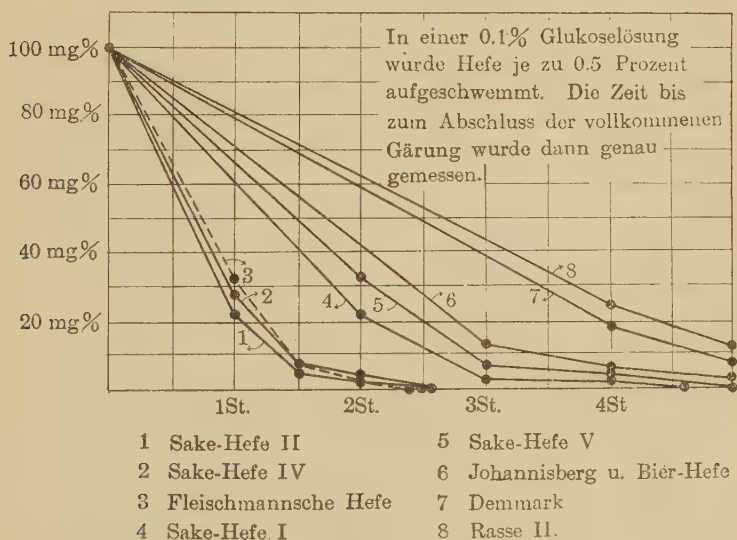
Für die Zuckerbestimmung auf fermentativem Wege ist es daher ausserordentlich wichtig, möglichst frische und recht wirksame Hefe in tunlichst geringer Menge anzuwenden, um damit innerhalb kürzester Frist eine Gärung zu erzielen.

Aus diesem Grunde habe ich vor dem Hauptversuch mehr als 10 Sorten Hefe auf ihre verschiedene Gärkraft hin verglichen. Der Versuch ergab, dass die Fleischmannsche und die Sake-Hefe Nr. II und IV besonders starke Gärkraft besitzen, sodass wir diese Hefearten auch zum Hauptversuch gebrauchten.

I. VORVERSUCH.

1. *Auswahl der wirksamsten Hefeart:* Es wurden von vielen, und zwar von über 10 Stämmen folgende Hefearten zum Vergleich der Gärwirkung auf Glukoselösung herangezogen: Fleischmannsche Hefe, Sake-Hefe Nr. I, II, IV und V, Brennerei-Hefe Rasse II und Demmark, Johannisberg II für Weinkeltern, Bier-Hefe, usw. Der Vergleichsversuch ergab, dass die Fleischmannsche und die Sake-Hefe Nr II und IV vor den anderen Sorten eine besonders starke Gärkraft besitzen. Vor allem aber liefert die Fleischmannsche Hefe reichlichst Hefepilze, sodass die Verwendung dieser Hefe zur Mikrobestimmung des wahren Zuckers sehr zweckmässig ist. Das Resultat zeigt Fig. 1.

Fig. 1.



2. *Optimaltemperatur für die Gärung:* Es wurden Versuche über die Optimaltemperatur der Fleischmannschen und der Sake-Hefe Nr. II und IV angestellt, und es ergab sich, dass diese Temperatur bei der ersteren 32°–37°C und bei den letzteren 28°–32°C beträgt (Tabelle I).

TABELLE I.

Temperatur	20°C	24°C	28°C	32°C	37°C	41°C
Fleischmannsche Hefe	40%	58%	80%	88%	93%	78%
Sake-Hefe Nr. II.	69%	82%	95%	95%	87%	65%

Einer 0,1%igen Glukoselösung wurde Hefe zu 0.1% zugegeben. Die Zuckermenge, die nach 8 Stunden vergoren hat, wurde mit % bezeichnet.

Wie aus Tabelle I leicht zu ersehen ist, hängt die Gärungszeit nicht wesentlich von der Temperatur ab. Eine strenge Einhaltung der Temperatur kommt deswegen bei der Hefemethode kaum in Frage. Die Gärungsversuche können aber in der Sommerzeit auch einfach bei Zimmertemperatur oder im Winter zweckmässig auch im Brutschrank bei 37°C angestellt werden.

3. *Reinigung der Hefe:* Für die quantitative Bestimmung des wahren Zuckers ist es unbedingt notwendig, unter allen Umständen die Hefe stets frisch zu bereiten. Zu diesem Zweck wurde Hefe Nr. II oder Nr. IV auf Schief-Kojiwasser-Agar (frisch herzustellen!) gezüchtet und 2–3 Tage bei 28°C gebrütet. Auf dem Nährboden ausgewachsene Hefepilze wurden dann in einer kleinen Menge von steriler Aq. dest. aufgeschwemmt. Die Hefeaufschwemmung wurde einmal stark zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit dekantiert. Die Hefepilze wurden nochmals mit steriler Aq. dest. gewaschen und wieder ausgeschleudert. Nach 2–3 mal wiederholtem Zentrifugieren war keine reduzierende Substanz mehr in der überstehenden Flüssigkeit nachzuweisen. Zur Anwendung der Fleischmannschen Hefe wurde die im Handel befindliche Ware gekauft. Diese wurde nach der gleichen Methode wie oben wiederholt gereinigt, bis sie von den reduzierenden Substanzen völlig befreit war. Diese gereinigte Hefe wurde sodann zur Bestimmung des Zuckers verwandt.

4. *Gebräuchlichste Dosierungen der Hefe zur Gärungsprobe:* Es versteht sich von selbst, dass die Anwendung zu kleiner Hefe-

TABELLE II.

Hefearten	Konzentra- tion der Hefe (%)	Zur Bestimmung angewandte Flüssigkeits- menge (cc.)	Reduzierende Substanz (Berechnet in mg Glukose)	
			Kontrolle (Aq. dest. + Hefe)	0.035% Glukoselösung. + Hefe
Sake-Hefe Nr. II	0.5	1.0	0	0
	1.0	1.0	0	0
	2.0	1.0	1	2
	3.0	1.0	3	5
Fleischmann- sche Hefe	0.5	1.0	0	0
	1.0	1.0	0	0
	2.0	1.0	2	2
	3.0	1.0	3	5

mengen leicht eine Verzögerung der Gärungsvorgänge verursachen, ferner, dass die Verwendung von zu grossen Mengen durch Einwirkung der reduzierenden Substanzen in der Hefe auch zu Fehlergebnissen führen kann. Eine genaue Dosierung der Hefe ist bei der Bestimmung also von grosser Bedeutung. Aus diesem Grunde wurden zunächst die reduzierenden Substanzen aus der Hefe ausgeschieden und daraufhin die zweckmässigste Dosierung der letzteren festgestellt.

In 4 Reagensgläschen wurden je 10.0 ccm einer 0.035%igen Glukoselösung, und in 4 Kontrollgläschen je 10.0 ccm destilliertes Wasser getan und dann noch gereinigte Hefe in fallender Konzentration, und zwar von 0.5%, 1.0%, 2.0%, und 3.0%, zugesetzt. Das Ganze wurde dann eine Stunde bei 32°C gebrütet (Tabelle III).

TABELLE III.

Konzentration der Glukoselösung	0.025%	0.035%	0.05%
Zeit bis zur Vollendung der Gärung	30 Minuten	40 Minuten	50 Minuten

Nach beendeter Gärung wurden 2.0 ccm der Flüssigkeit in ein Zentrifugenglass eingebracht und zentrifugiert, um die Hefe sich

absetzen zu lassen. Mit 1.0 ccm der überstehenden Flüssigkeit wurde das Reduktionsvermögen der hefefreien Flüssigkeit festgestellt. Hierbei ergab sich, dass bei der Anwendung von 2 und 3%iger Hefeaufschwemmung die reduzierende Substanz in der überstehenden Flüssigkeit doch noch mehr oder weniger nachzuweisen war. Deshalb erscheint es sehr ratsam, bei der Zuckerbestimmung auf fermentativem Wege am besten eine 1.0%ige Hefeaufschwemmung anzuwenden.

5. *Dauer der Gärung:* Da es für die Zuckerbestimmung auch von Wichtigkeit ist, die Gärung nach Möglichkeit zu beschleunigen, habe ich weitere Untersuchungen vorgenommen, um eine optimale Gärungsfrist festzustellen.

Den Glukoselösungen verschiedener Konzentration wurde Hefe je zu 1.0% zugesetzt. Das Ganze wurde dann im Brutschrank bei 32°C aufgehoben. Je 1.5 ccm dieser Flüssigkeiten wurden alle 10 Minuten entnommen und scharf zentrifugiert. 1.0 ccm der so erhaltenen überstehenden Flüssigkeit wurde schliesslich zur Bestimmung der Reduktionskraft verwandt. Die Zeit, in der das Reduktionsvermögen der Flüssigkeit auf Null reduziert wurde, wurde genau gemessen. Sie reicht für den Gärungsprozess aus und hängt offenbar von der entsprechenden Zuckerkonzentration ab. Bei der Bestimmung des wahren Zuckers kann diese Gärungszeit deswegen je nach Stärke der Gesamt-Reduktion des Blutes auf die gewünschte Dauer gebracht werden. Die Bestimmung ist dann noch genauer und sogar einfacher ausführbar.

6. *Bestimmungsmethode des Reduktionswertes:* Zur Bestimmung des Reduktionswertes habe ich das Hagedorn-Jensen'sche Verfahren angewandt.

II. HAUPTVERSUCH.

Im Anschluss an die orientierenden Versuche habe ich mit drei verschiedenen, mir als Mikromethoden wesentlich erscheinenden Verfahren folgende Untersuchungen vorgenommen, in denen ich den wahren Zuckerwert des Blutes unter Benutzung möglichst kleiner Blutmengen und unter Anwendung der technisch ein-

facheren Methode ermittelt habe. Hierbei wurden die Methoden auch auf ihre Brauchbarkeit verglichen.

Ausführung der Bestimmung:

Methode I. a.) Bestimmung der Gesamt-Reduktion des Blutes nach der Hagedorn-Jensenschen Methode.

b.) Bestimmung der Rest-Reduktion des Blutes wie folgt:

In ein steriles Reagensgläschen bringt man 1.0 ccm einer 1%igen frisch zubereiteten Hefeaufschwemmung und 0.1 ccm Blut ein. Das Ganze lässt man eine Zeitlang bei 32°C vergären (Tabelle III). Das Enteiweissen erfolgt nach Hagedorn-Jensen. In diesem Filtrat wird der Restreduktionswert ermittelt. Aus der Differenz des Gesamt- und Rest-Reduktionswertes ergibt sich der wahre Zuckerwert des Blutes.

Methode II. a.) In einem Zentrifugenglas werden 2.0 ccm n. 15 Schwefelsäure und 0.2 ccm Blut vermischt, noch 0.8 ccm einer 2.5%igen Natriumwolframatlösung hinzugefügt und dann kräftig geschüttelt. Dadurch erfolgt das Enteiweissen (Enteiweissungsmethode nach Folin-Wu). Durch Zentrifugieren erhält man ca. 2.4 ccm der hierbei überstehenden 15fach verdünnten Flüssigkeit. Diese wird weiter mit Hilfe einer oben mit einer ballartigen Saug-Gummitaktur versehenen Pipette abgehebert und ins andere Zentrifugenglas eingebracht. 1.0 ccm der nochmals zentrifugierten Flüssigkeit wird schliesslich zur Bestimmung der Gesamt-Reduktion nach Hagedorn-Jensen verwandt.

b.) In der Restflüssigkeit werden etwa zwei Ösen der Hefe aufgeschwemmt und ähnlich wie in Tabelle II für eine bestimmte Zeit bei 32°C gebrütet. Nach beendeter Gärung wird die Flüssigkeit zentrifugiert. 1.0 ccm der geklärten Flüssigkeit wird dann zur Bestimmung der Restreduktion nach Hagedorn-Jensen verwandt. Hierbei ist die Differenz der Gesamt- und der Rest-Reduktion als wahrer Zuckerwert zu bezeichnen.

Methode III. a.) Ein Zentrifugenglas (Glas I) wird mit 1.0 ccm n/15 Schwefelsäure und ein anderes Glas (Glas II) mit 0.5 ccm einer frisch zubereiteten 2%igen Hefeaufschwemmung beschickt. Beiden Gläsern werden je 0.1 ccm Blut und dem Glas I ausserdem 0.4 ccm einer 2.5% Natriumwolframatlösung zugesetzt.

TABELLE IV.

Nr.	Methode	Gesamt-Reduk- tionswert	Rest-Reduk- tionswert	Wahrer Zuckerwert
		mg	mg	mg
Kaninchen- blut 1	I	80	11	69
	II	102	31	71
	III	102	32	70
2	I	84	11	73
	II	117	41	76
	III	118	44	74
3	I	90	14	76
	II	125	45	80
	III	126	47	79
4	I	116	12	104
	II	138	34	104
	III	138	33	105
5	I	105	21	84
	II	123	39	84
	III	123	40	83
6	I	114	18	96
	II	145	46	99
	III	145	49	96
7	I	88	14	74
	II	132	55	76
	III	132	55	76
8	I	85	10	75
	II	122	47	75
	III	122	47	75
9	I	114	9	105
	II	141	36	105
	III	141	38	103
10	I	96	22	74
	II	116	42	74
	III	117	44	73
Diabetiker W	I	270	18	252
	II	309	53	256
	III	310	57	253
T	I	174	15	159
	II	200	44	156
H	I	141	11	130
	II	157	28	129
M. O.	I	132	5	127
	II	156	27	129

Nach Enteiweissung und darauffolgender Zentrifugierung von Glas I erhält man ca. 1.1 ccm der klaren überstehenden Flüssigkeit, wovon 1.0 ccm zur Ermittlung der Gesamt-Reduktion nach Hagedorn-Jensen verwandt wird.

b.) Das andere Zentrifugenglas (Glas II) wird inzwischen bloss für eine bestimmte Zeit bei 32°C der Gärung überlassen. Nach beendeter Brutzeit wird das Glas mit 0.5 ccm 2n/15 Schwefelsäure und 0.4 ccm einer 2.5%igen Natriumwolframatlösung beschickt und kräftig geschüttelt, wodurch das Enteiweissen erfolgt. Durch Zentrifugieren erhält man eine klare überstehende Flüssigkeit. 1.0 ccm davon wird dann zur Bestimmung der Restreduktion verwandt. Hierbei ist die Differenz beider Reduktionswerte als wahrer Zuckerwert zu bezeichnen.

N.B. Bei der Errechnung des wirklichen wahren Zuckerwertes nach der Hagedorn-Jensenschen Rechnungstafel darf man die erhaltene Zahl einmal mit 1.5 multiplizieren, da die nach Methode II und III gewonnene überstehende Flüssigkeit auf genau das 1.5fache eingestellt worden ist.

Betrachtet man nun die Resultate bei den obenstehenden 3 verschiedenen Bestimmungsmethoden, so sind Gesamt- und Rest-Reduktionswert nach Methode I erheblich kleiner als die entsprechenden Werte nach Methode II und III, während die Bestimmung des wahren Zuckers bei allen Methoden ganz gleich ausfällt. Die Gesamt- und Rest-Reduktion, sowie der wahre Zucker sind jedoch bei der Methode II und III wertmässig fast gleich. Was die Genauigkeit anbetrifft, so weist Methode I aber dann technische Fehler auf, wenn die Bestimmung nicht sorgfältigst ausgeführt wird, weil dabei die Reduktion auch durch Hefe erfolgen kann. Die Steigerung des Reduktionswertes dürfte wohl darauf zurückzuführen sein, dass trotz temporären Erwärmens doch noch Partikelchen oder irgendwelche reduzierende Substanzen der Hefe in Freiheit gesetzt werden.

Um diesen Nachteil der Methoden zu beseitigen, habe ich das Filtrat mit Zusatz von Hefe eine Zeitlang vergären lassen. Dies ist aber wegen ungenügender Fermentation nicht gelungen. Bei Methode II und III war die zentrifugierte Flüssigkeit völlig von

TABELLE V.

Blut cem	Zugesetzte Menge der Glukoselösung		Unter- suchte Menge des 1:15 Fil- trates	Reduktionswert (in mg Glukose)		Wahrer Zuckerwert	
	Konzen- tration der Glukoselö- sung %	Volumen der Glukose- lösung cem		Gesamt- reduk- tions- wert	Rest- reduk- tions- wert	Ge- fundene Menge	Kalku- lierte Menge
0.2			1.0	mg 144	mg 48	mg 96	
0.2	0.008	1.0	1.0	184	48	136	136
0.2	0.004	1.0	1.0	163	49	114	116
0.2	0.002	1.0	1.0	154	47	104	106
0.2			1.0	123	39	84	
0.2	0.008	1.0	1.0	161	40	121	124
0.2	0.004	1.0	1.0	144	40	104	104
0.2	0.002	1.0	1.0	131	39	92	94
—	0.008	1.0	—	80	0		
—	0.004	1.0	—	40	0		
—	0.002	1.0	—	20	0		

der Hefe befreit, sodass diese beiden Methoden keine technischen Fehler aufweisen. Methode II und III sind deswegen als Mikromethoden zur Bestimmung des wahren Zuckers praktisch sehr gut verwendbar. Methode III hat aber den Nachteil, dass die Enteiweissung zweimal zu wiederholen ist. Methode II hingegen ist technisch sehr einfach und ergibt ein exaktes Resultat. In dieser Hinsicht dürfte man wohl annehmen können, dass letztere sich als die gebräuchlichere Methode bewähren wird.

Weiter wurde die Genauigkeit dieser Methode folgendermassen geprüft:

Zuerst stellte man Glukoselösung verschiedener Konzentrationen her. In einem Zentrifugenglas wurden 1.0 cem 2n/15 Schwefelsäure, 1.0 cem Glukoselösung und 0.2 cem Blut vermischt, 0.8 cem einer 2.5% Natriumwolframatlösungen hinzugefügt, stark geschüttelt und zentrifugiert. Von der dann überstehenden Flüssigkeit wurde der Reduktionswert vor und nach der Fermentation

ermittelt. Die Differenz dieser beiden Werte wurde auf den Reduktionswert der glukosefreien überstehenden Flüssigkeit und der Zuckerlösungen bezogen, wobei kalkulierte sowie gefundene Menge einen fast gleichen Wert zeigten.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Zuerst wurden besonders stark wirksame Hefearten herausgefunden, gereinigt, und deren gebräuchlichste Dosierungen genau festgestellt. Ebenso wurde die Optimaltemperatur für die Blutzuckergärung bestimmt und eine Mikromethode zur Bestimmung des wahren Zuckers im Blut ersonnen. Es ist uns gelungen, mittels dieser Mikromethode die Arbeitszeit wesentlich zu verkürzen und unerwünschte Verunreinigungen der Probe mit der reduzierenden Substanz, die von der Hefe her stammt, völlig zu beseitigen.

Bei der Ausführung dieser Methode ist keine grosse Blutmenge notwendig. Zur exakten Bestimmung des wahren Zuckers kommt man mit einer so kleinen Blutmenge wie 0.2 ccm vollkommen aus. Die Gärung erfolgt innerhalb ganz kurzer Zeit. Auch bei der Blutentnahme ist kein besonderes Vorgehen zur Vorbeugung irgendeiner Blutgerinnung notwendig, sondern man kann das Blut einfach durch einen Stich ins Ohrfläppchen oder die Fingerspitze in genügender Menge erhalten und direkt abpipettieren.

2. Die verschiedenen Enteiweissungsmethoden können auch einen mehr oder weniger schwankenden Restzuckerwert des Blutes bedingen, sodass, wenn man den Zucker nach Hagedorn-Jensen bestimmt, der Restzuckerwert im Filtrat, das nach Folin-Wu enteiweisst worden ist, viel grösser ist als in dem Filtrat, das nach Hagedorn-Jensen enteiweisst worden ist.

Ich danke zum Schluss Herrn Dr. Takeda für seine stete Anregung und Hilfe, Herrn Prof. Kakiuchi (Universität zu Tokyo) für seine freundlichen Ratschläge zu dieser Arbeit.

Vortrag, gehalten in der biochemischen Sektion des ordentlichen Kongresses der Japanischen medizinischen Gesellschaft am 2. April 1930 in Osaka.

LITERATUR.

- Nakamura, K. und Ogawa, T. (1928): Nippon-Shokakibyō-Gakukkai-Zasshi, **27**.
- Shaffer, P. A. and Hartmann, A. F. (1920-21): J. of Biol. Chem., **65**.
- Somogyi, M. (1926): J. Biol. Chem., **70**.
- Somogyi, M. (1927): J. Biol. Chem., **75**.
- West, Edward S., Scharles, Frederick H., and Peterson Vernon L. (1929): J. Biol. Chem., **82**.

CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VITAMIN B₁.

VON

HIROSHI MISAWA.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der
Kaiserlichen Kyushu-Universität zu Fukuoka.
Direktor: Prof. Dr. K. Kodama.)*

(Eingegangen am 17. Februar 1932)

INHALT.

- I. Einleitung.
- II. Experimenteller Teil.
 - A. Feststellung der Aktivität des fraktionierten Prinzips.
 - B. Chemische Untersuchungen.
 - a. Fraktionierung des wirksamen Prinzips nach der Methode von Jansen und Donath.
 - b. Bestimmung der Gesamt-Phosphorsäure.
 - c. Polarisationsvermögen.
 - d. Die Farbenreaktion.
 - e. Eine relativ einfache Methode der Darstellung des klinisch anwendbaren, konzentrierten, antineurischen Vitamins.
 - f. Ein einfaches Konzentrationsverfahren.
 - g. Absorptionsspektrum.
- III. Zusammenfassung.
- IV. Schlussätze.

I. EINLEITUNG.

Es sind bereits 20 Jahre vergangen, seit das Vitamin B entdeckt wurde. Trotzdem aber sind die eifrigsten Bemühungen, das Vitamin B in chemisch reinen Kristallen herzustellen, bisher immer noch nicht von einem befriedigenden Erfolge gekrönt gewesen.

Im Jahre 1926 haben Jansen und Donath in dem in der Vitamin-Geschichte rühmlichst bekannten Eijkman'schen Laboratorium in Java aus Reiskleie hochwirksame reine Kristalle isoliert. Ihren Berichten zufolge bilden diese Kristalle im Rohzustande Nadelbündel, während das rekristallisierte, reine Präparat in Barrenform mikrophotographisch rosettenartige Häufchen zeigte.

Dieses Präparat ist nicht hygroskopisch und löst sich in Wasser und Methylalkohol sehr leicht, dagegen nicht so leicht in Äthylalkohol. Die Pauly'sche Diazo-Reaktion fällt stark positiv aus. Der Schmelzpunkt liegt bei 250°C. Die Bruttoformel ist: $C_6H_{10}ON_2HCl$. Das wirksame Minimum beträgt 0,002 mg pro "Bondol" (ein indischer Reisivogel) pro die oder 0,012 mg pro Taube pro die. Versuche über die für das normale Wachstum von jungen Ratten erforderliche minimale Dosis wurden von den Verff. anscheinend nicht vorgenommen.

Die Ausbeute beträgt nur 100 mg auf 300 kg Reiskleie, ist also ausserordentlich gering und kostspielig. Trotzdem muss, wenn die Kristalle wirklich chemisch rein und in so geringen Dosen wirksam sind, das Ergebnis der mühevollen Untersuchungen der Verff. als durchaus befriedigend betrachtet und ihnen als ein grosses wissenschaftliches Verdienst angerechnet werden.

Guha und Drummond (1929) haben als Ausgangsmaterial "Bemax" (Weizenkeime) benützt und der Methode von Jansen und Donath folgend die Konzentration durchgeführt, wobei sie bis zur Platinchlorid-Stufe die Ergebnisse der Holländer bestätigen konnten.

Williams, Waterman und Gurin (1930) führten eine Nachprüfung der erstgenannten Methode mittels Bierhefe und auch Reiskleie durch. Sie fanden, dass bei Bierhefe mit der Fraktionierung das wirksame Prinzip allmählich verloren ging und dann gänzlich verschwand. Bei Anwendung von Reiskleie konnten sie nur zweimal Kristalle erhalten, und diese unterschieden sich von den oben genannten holländischen Kristallen im wesentlichen dadurch, dass sie hygroskopisch und der Form nach tablettenförmig waren. Williams und seine Mitarbeiter haben sich darauf von Jansen persönlich die Kristalle demonstrieren lassen (der Schmelzpunkt dieser Kristalle war nicht konstant 250°C und Jansen selbst hielt sie nur für zu 95% rein), andererseits haben Williams und seine Mitarbeiter dann mit dem von Jansen erhaltenen Präparat Tierversuche angestellt, nach denen sie sich betr. der Reinheit der Kristalle, ihrer Wirkung und der angegebenen Formel sehr skeptisch äusserten.

Erwähnt sei noch, dass auch Mukherji (1929) nach der holländischen Methode aus Reiskleie wirksame Kristalle isolieren konnte.

Um nun festzustellen, ob wirklich durch die genannte Methode ein wirksames kristallinisches Präparat erhältlich ist, habe ich Reiskeime als Ausgangsmaterial gewählt und mich bei der Isolierung des Vitamin B₁ in der Hauptsache an die Methode von Jansen und Donath gehalten.

Da auch über die Farbenreaktion des Vitamin B bis heute noch sehr verschiedene Ansichten herrschen, so habe ich aus den einzelnen Fraktionen gleichprozentige Lösungen hergestellt und bezügl. dieser Reaktion kritische Beobachtungen angestellt.

Weiter habe ich die Ergebnisse der bisherigen Vitamin-Forschung berücksichtigend eine relativ einfache Darstellungsmethode erdacht und ausgearbeitet, durch die ohne beträchtliche Verluste des wirksamen Prinzips ein klinisch anwendbares konzentriertes Präparat erhältlich ist.

Schliesslich konnte ich dann durch Untersuchung des Absorptionsspektrums des Vitamin B₁ einige sehr interessante Tatsachen beobachten.

II. EXPERIMENTELLER TEIL.

A. Feststellung der Aktivität des fraktionierten Prinzips.

Um die Wirkung der dargestellten Präparate zu bestimmen, habe ich als Grundregel den Heilerfolg derselben bei der typischen Kopfretraktion (Opisthotonus) der Taube und parallel zu diesem Versuche auch Wachstumsversuche mit jungen Ratten vorgenommen.

Taubenversuch:—Ich habe den vom biochemischen Institut in Oxford angenommenen Masstab benützt (Kinnersley, Peters und Reader 1928). Wenn ich die Tiere vom Tierhändler gekauft hatte, habe ich sie anfangs mindestens eine Woche lang mit Sojabohnen gefüttert und die Tiere überhaupt so gehalten, dass alle Interferenzen, die Unterschiede in den Lebensbedingungen hervorrufen könnten, möglichst vermieden wurden. Sodann wurden

die Tiere in Käfige aus Drahtgitter von 40 cm Durchmesser und 52 cm Höhe einzeln eingesperrt und bei einer konstanten Zimmertemperatur von 10°–15°C. gehalten. Der Boden des Käfigs wurde alle 3 Tage einmal gereinigt, und es wurde darauf geachtet, dass sich die Exkremente nicht ansammelten. Gefüttert wurden die Tiere dann mit gründlich gewaschenem getrocknetem, poliertem Reis und Brunnenwasser ad libitum. Als Versuchstiere wurden dann solche Tiere ausgewählt, die binnen eines Monats den typischen Krampfanfall zeigten. Diese wurden dann, um Spontanheilungen zu vermeiden, nach Auftreten des Krampfes 1–2 Stunden beobachtet und darauf das betr. Präparat in den Pektoralmuskel injiziert. Als positiv ausgefallen bezeichne ich die Fälle, in denen der Krampf nachliess, die Beinparese sich besserte, und ein Wiederauftreten des Krampfes bzw. der Exitus letalis während länger als 3 Tagen verhindert werden konnte.

Rattenversuch:—Da das Wachstum der jungen Ratten auffallende individuelle Verschiedenheiten zeigt, so habe ich zur Vermeidung der damit verbundenen Ungenauigkeiten als Versuchstiere nur in unserem Laboratorium von derselben Ratte geborene Junge von ungefähr 40 g Körpergewicht ausgewählt. Diese wurden in kleinen Käfigen aus Drahtgeflecht mit einem Durchmesser von 23 cm und einer Höhe von 25 cm isoliert. Das Drahtgeflecht des Käfigbodens erhielt eine Maschenweite, die es ermöglichte die Kotballen der Ratte frei durchfallen zu lassen, da sonst, wie schon Steenbock, Sell und Nelson (1923) beobachtet haben, die Ratten ihren eigenen Kot fressen, und der Versuch somit gestört werden kann. Als Standardnahrung habe ich die w. u. angegebenen Nährstoffe angesetzt. Wo es nötig war, habe ich als Vitamin B₂ medizinische Hefe im Autoklaven 6 Stunden lang bei 121°C. erhitzt und davon dann der Nahrung 5% hinzugefügt, während von dem Reismehl dann das entsprechende Quantum abgezogen wurde.

Technisches Kasein (Merck-Darmstadt)	10.0%
McCullum'sches Salzgemisch (No. 318)	3.6%
Butter	5.0%
Reismehl	81.4%

Durchschnittlich beginnt das Körpergewicht in der dritten Woche abzunehmen. Da zuweilen schon zu dieser Zeit eine leichte Parese der Hinterfüsse eintritt, so habe ich schon zu dieser Zeit das zu prüfende Material der Standardnahrung zugesetzt und den Einfluss beobachtet. Das zu prüfende trockene Material wurde immer in Wasser von einem P_H von 4,0 aufgelöst angewendet. Ich habe die als "echte Refektion" (Fridericia und Mitarbeiter 1928) zu betrachtenden Erscheinungen zwar nicht recht beobachten können, da aber bei zu kurzer Beobachtungsdauer Fälle vorkommen, die mit Refektion verwechselt werden können, habe ich die Beobachtung immer auf mindestens 6 Wochen ausgedehnt.

B. Chemische Untersuchungen.

a. *Fraktionierung des wirksamen Prinzips nach der Methode von Jansen und Donath.*

Man hat früher im allgemeinen angenommen, dass das im Getreide enthaltene Vitamin B in den Hülsenhäutchen reichlich enthalten sei; durch die Forschungen von McCollum und Davis (1915) u. a. m. aber ist klar geworden, dass es am reichlichsten in den Keimen vorkommt. Shimazono (1920) fand bei seinen Untersuchungen, dass bei Zusatz von Reiskeimen zu poliertem Reis in einem Verhältnis von 3% Tauben in normalem Ernährungszustande erhalten werden können, ja selbst eine Gewichtszunahme zeigen. Fig. 1 zeigt eine Vergleichsfütterung bei Zusatz von 5% Reiskeimen bzw. 1% Oryzaninpulver des Handels in ihren Resultaten. Es ist also ganz klar, dass in den Reiskeimen reichlich Vitamin B enthalten ist. Da wir eine ausgezeichnete Vorrichtung haben, durch die auf dem Wege des Reinigungsverfahrens die Reiskeime allein von den Körnern getrennt werden können, sodass deren Preis nicht zu teuer ist, habe ich diese als Ausgangsmaterial zu meinen Untersuchungen gewählt.

Extraktion:—2,5 kg Reiskeime wurden mit 7,5 l 50%igem Alkohol, der 0,5% HCl enthielt, in einen Kolben eingebracht und auf dem Wasserbade bei 60°–70°C. 4 Stunden lang extrahiert. Es ist zweckmässig, dabei mit Hilfe des elektrischen Rührwerks den Inhalt fortwährend umzurühren. Dann wird der Kolbeninhalt

Fig. 1.

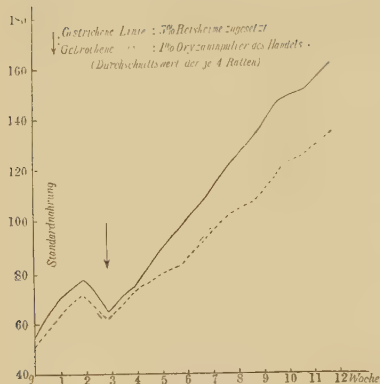
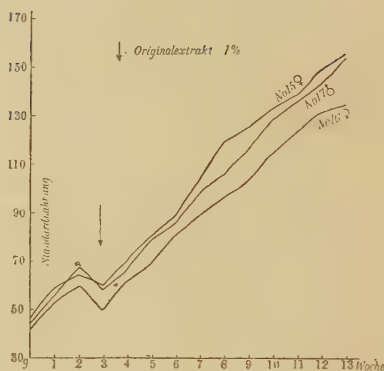


Fig. 2.



zuerst in einem Leinwandsack ausgepresst und dann mit einer grossen Nutsche (Durchmesser 30 cm) abgesogen. Dabei werden ungefähr 5l Filtrat gewonnen. Wenn diese dann bei niedriger Temperatur (bis 60°C.) durch Vakuumdestillation auf ungefähr 500 ccm eingengt werden, erhält man einen gelbbraunen klebrigen Sirup. Fig. 2 zeigt das Resultat bei Hinzufügung von 1% dieses Sirups zu der Standardnahrung. Es werden ca. 40% Trockensubstanz erhalten, deren Gesamtstickstoffgehalt 3.12% beträgt. Auf diese Weise ist das in den Reiskeimen enthaltene Vitamin fast vollständig extrahierbar.

Erste Stufe. ("Acid-clay"-adsorption):—Zu Beginn meiner Versuche habe ich "Fuller's earth" angewendet, da aber Kinugasa (1928) berichtet hat, dass die Adsorptionskraft des japanischer "acid clay" besser ist, so habe ich vergleichende Versuche mit beiden Adsorptionsmitteln angestellt. Dazu habe ich die mit beiden Mitteln erhaltenen Filtrate auf 1/10 des Anfangsvolumens der Mutterlösung eingengt und davon dann je 5% der Standardnahrung hinzugefügt. Danach zeigt sich (Fig. 3), dass die "acid clay"-Versuche fast mit der Kontrolle übereinstimmen, und 2 Ratten nicht weiter wuchsen; bei Anwendung von "Fuller's earth" aber war das Wachstum fast normal. Daraus ergibt sich, dass "acid clay" das bessere Adsorptionsmittel ist, und ich habe deshalb nur noch dieses verwendet. ("Acid clay" von Shimadaiku, Osaka.)

Zu 1 Liter des oben genannten Sirups (entsprechend 5 kg Reiskeimen) wurden 9l destillierten Wassers hinzugesetzt und gut umgerührt. Die gewöhnliche Lösung hat dann einen P_H von 4,5; falls nicht, so wird sie durch Einträufeln von Schwefelsäure auf P_H 4,5 adjustiert. Danach werden 500 g acid clay zugesetzt, und es muss während 30 Minuten kräftig umgerührt werden. Während 2–3 Stunden lässt

man dann an einem kalten Orte abstehen, siphoniert, sobald sich das acid clay abgesetzt hat, ab, saugt das aktivierte acid clay mit der grossen Nutsche ab und wäscht mit Wasser von P_H 4,5 aus. Um das Vitamin wieder zu befreien nimmt man je 50 g "acid clay" in einen Mörser, zerreibt sie einige Minuten lang kräftig mit 200 ccm Barytwasser und nutscht dann möglichst rasch mit der grossen Nutsche ab. Um das Filtrat möglichst sofort sauer machen zu können, wird es in einen mit 160–180 ccm 1 Mol. Schwefelsäure beschickten Kolben eingeführt. Dann wird mit einem kleinen Volum Barytwasser und zuletzt mit Wasser ausgewaschen. Wenn man dann das entstandene Bariumsulfat entfernt, so erhält man eine gelbbraune, schöne klare Flüssigkeit. Diese wird bei niederer Temperatur (bis zu 60°C.) im Vakuum bis auf 400 ccm konzentriert, wodurch ein saucenartiger dünner, brauner Extrakt gewonnen wird. Die Fig. 4 zeigt das Ergebnis von Fütterungsversuchen bei Hinzufügung von 0,5% nur dieses Extraktes und von 5% des Vitamin B₂.

Nach Salmon, Guerrand und Hays (1928) ist die Adsorptionskraft von Fuller's earth gegen die verschiedenen Arten des Vitamin B von der Wasserstoff-Ionen-Konzentration des Mediums abhängig. Der optimale P_H für Vitamin B₁ beträgt 4,0–4,5, der

Fig. 3.

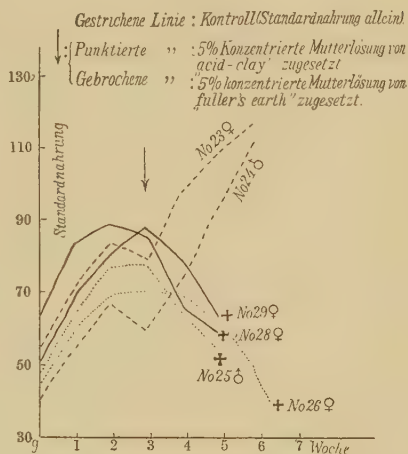
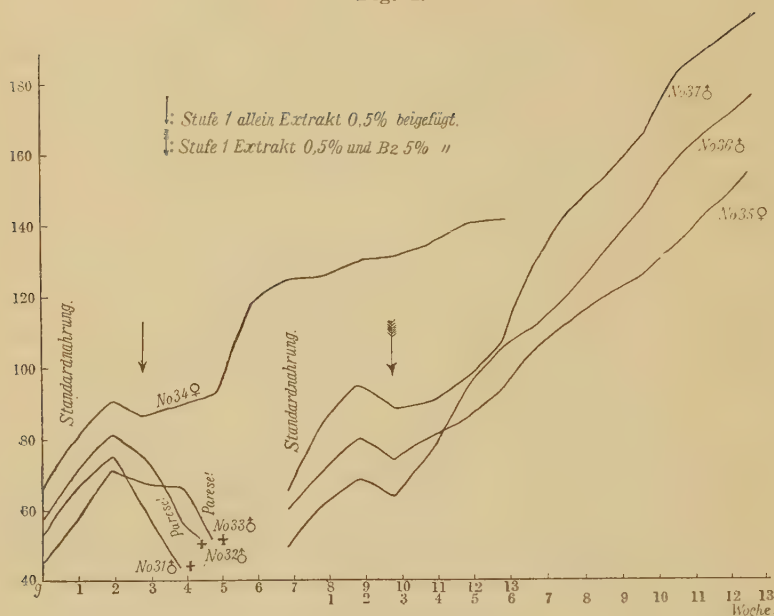
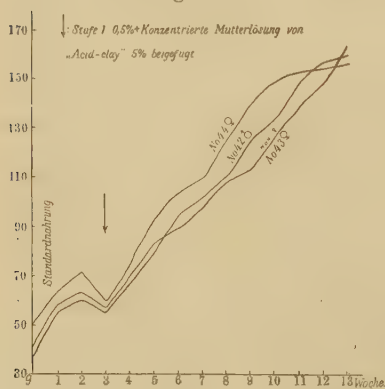


Fig. 4.



für Vitamin B₂ aber 0,08. Es verliert also B₂ mit der Abnahme der Azidität des Mediums allmählich seine Adsorbierbarkeit, welche bei PH 6,3 das Minimum erreicht. Wenn also die Adsorption bei PH 4,5 vor sich geht, dann bleibt das B₂ zum grössten Teile in der Mutterlösung zurück und die aktivierte Fuller's earth enthält dann

Fig. 5.



also hauptsächlich Vitamin B₁. Solche Verhältnisse werden wahrscheinlich auch bei dem acid clay eine Rolle spielen. Das wird uns recht deutlich, wenn wir einmal die Fig. 3 mit der Fig. 5 vergleichen.

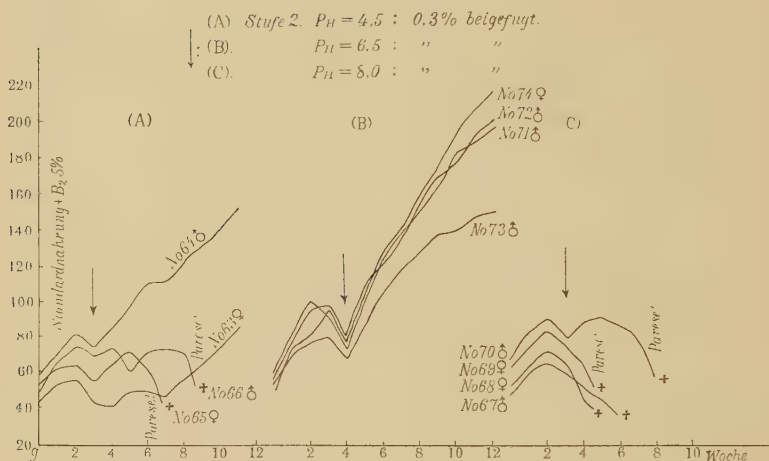
Der erhaltene Extrakt enthält ca. 9,6% Trockensubstanz mit einem Gesamtstickstoffgehalt von 6,4%. Ca. 80% des Vitamins der Reis-

keime sind in diesen Extrakt übergegangen.

Zweite Stufe (Silberfraktionierung):—Wenn man zu 800 ccm des vorigen Extraktes (entsprechend 10 kg Reiskeime) 45 ccm 50% iger Silbernitratlösung hinzufügt, und zwar unter beständigem Umrühren, so bildet sich ein voluminöser, gelbbrauner Niederschlag in reichlicher Menge. Es wird dann unter beständigem Umrühren langsam und tropfenweise gesättigte Barytlösung hinzugegeben, bis der P_H 4,5 beträgt. Der gebildete Niederschlag wird abgesogen, dem klaren Filtrat weiter tropfenweise gesättigte Barytlösung hinzugegeben, und der P_H auf 6,5 adjustiert. Man lässt weiter eine Nacht im Refrigerator stehen, saugt den sedimentierten Niederschlag ab, fügt dem klaren Filtrat abermals gesättigte Barytlösung hinzu und stellt den P_H auf 8,0 ein. Der entstandene Niederschlag wird wieder abgesogen. Dann werden die Niederschläge, die sich bei P_H 4,5 bei P_H 6,5 und bei P_H 8,0 gebildet haben, einzeln in Mörsern mit je 120 ccm $\frac{1}{2}$ Mol. HCl versetzt, zerrieben und das entstandene Silberchlorid entfernt. Wenn man weiter die überschüssige HCl mit NaOH neutralisiert, so erhält man eine dunkel gefärbte Lösung. Jansen und Donath haben behauptet, dass die P_H 4,5-Fraktion ganz inaktiv sei, die P_H 6,5-Fraktion zu 50% Vitamin enthalte, und die P_H 8,0-Fraktion neben reichlichem Vitamin auch noch reichlich unreine Beimengungen enthalte. Drummond und Guha (1929) fanden die P_H 4,5—ebenso wie die P_H 8,0-Fraktion völlig inaktiv. Williams, Waterman und Gurin (1930) berichteten ganz im Gegenteil wieder, dass etwa 20% des gesamten Vitamins in der P_H 4,5-Fraktion sich vorfinde. Es stimmen also die verschiedenen Berichte noch garnicht überein. In Fig. 6 habe ich nun die Ergebnisse der Wachstumsversuche bei Zusatz von je 0,3% der drei verschiedenen Fraktionen zu der Standardnahrung plus 5% Vitamin B₂ wiedergegeben. Danach ist jedenfalls sicher, dass zum mindesten der grösste Teil des Vitamins in die P_H 6,5-Fraktion übergeht. Diese Fraktion enthält 5,1% Trockensubstanz und in dieser 12,95% Gesamtstickstoff. Die Vitamin-Ausbeute beträgt etwa 20%.

Dritte Stufe (Phosphorwolframsäure-Behandlung):—Ich habe nur die P_H 6,5-Fraktion weiter verwendet. Die Gesamtazidität

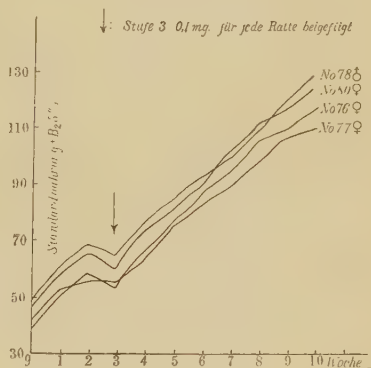
Fig. 6.



dieser Fraktion (berechnet auf Schwefelsäure) habe ich auf 5% reguliert. Dann wurde zu 5%iger Schwefelsäure gesättigte Phosphorwolframsäure etwas im Überschuss hinzugegeben und das Ganze 24 Stunden lang im Refrigerator stehen gelassen. Die sedimentierte Phosphorwolframatfällung wurde abgesogen und mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen. Das Gewicht des Niederschlags betrug im feuchten Zustande 8–9 g. Dieser Niederschlag wurde in einen Mörser genommen, 100 ccm 50%iges Azetonwasser hinzugefügt, verrieben und so grösstenteils aufgelöst. Nach Stehenlassen während einiger Zeit fällt der sehr spärliche nicht lösliche Rückstand aus und wird abfiltriert. Das klare, rote Filtrat wird in 400 ccm 5%ige Schwefelsäure eingegeben. Daraufhin scheidet sich in reichlicher Menge ein leicht gelblich-brauner Niederschlag aus. Dieser wird nach Abstehen während 36 Stunden im Refrigerator mittels Glassfilter abfiltriert und einmal mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen. Nach Abtrocknen im Exsikkator beträgt das Gewicht dieses Niederschlags 2–3 g. Er wird nun abermals in einen Mörser eingetan, zu feinem Pulver verrieben und in 60 ccm 50%igen Azetonwassers aufgelöst, worauf man eine fast klare, stark rötliche Flüssigkeit erhält. Dazu wird gesättigte Barytlösung tropfenweise unter Umrühren zugesetzt, bis definitiv

mit Phenolphthalein Rotfärbung eintritt; das entstandene Bariumsulfat wird möglichst rasch abgesogen und das Filtrat sofort angesäuert. Zu diesem Zwecke wird zuerst eine geeignete Menge N-Schwefelsäure in den Filterkolben eingebracht, das entstandene Bariumsulfat vollständig entfernt und die überschüssige Schwefelsäure im Filtrat mittels Barytwassers neutralisiert. Das erhaltene ganz klare Filtrat wird dann bei anfangs niedriger Temperatur (bis 40°C.) im Vakuum konzentriert; und wenn man dann den Rückstand im Natronkalk-Exsikkator vollends trocknet, so erhält man einen gelbbraunen, stark zerfließenden Rückstand, dessen Menge zwar immer schwankt, durchschnittlich aber 200 mg beträgt. Von diesem Rückstand habe ich einer Ratte 0,1 mg täglich zu der Standardnahrung plus Vitamin B₂ 5% hinzugegeben und dabei das in Fig. 7 gegebene Ergebnis gezeigt. Die Vitamin-Ausbeute beträgt nicht mehr als 10%.

Fig. 7.



Vierte Stufe (Platinchlorid-

stufe):—Den obigen Rückstand habe ich mit einer Gesamtmenge von 250 ccm absolutem Alkohol extrahiert. Um diese Extraktion möglichst vollständig zu machen, habe ich den Rückstand in mehrere Portionen geteilt und warm (bis zu 60°C.) extrahiert. Der unlösliche Rückstand wurde entfernt, dem ganz klaren Filtrat 5%ige Lösung von Platinchlorid in absolutem Alkohol etwas im Überschuss (ca. 5–6 ccm) hinzugegeben, umgerührt und stehen gelassen, worauf ein matt strohgelbes Präzipitat ausfällt. Das Filtrat wurde weiter 24 Stunden lang im Refrigerator stehen gelassen, filtriert, der Rückstand in salzsäurehaltigem Wasser suspendiert (ein Teil löst sich nicht), mit Schwefelwasserstoffgas durchströmt, wieder eine Nacht im Refrigerator stehen gelassen, und dann das sedimentierte Platinsulfid abfiltriert. Das so gewonnene zitronengelbe, klare Filtrat wurde im Natronkalk-Exsikkator getrocknet, worauf ein gelb-

brauner hygroskopischer Rückstand erhalten wurde. Die Ausbeute schwankt sehr.

Präparat 1.—Das Gewicht des Präparats betrug 13,8 mg (entsprechend ca. 10 kg Reiskeimen). Es besteht unter dem Mikroskop gesehen (Photographie 1) zum grössten Teile aus rosettenartig angehäuften Kristallen. Wenn man von diesen nur ein kleines Teilchen auf einen Objektträger bringt, einen Tropfen Wasser darauf träufelt und mit der Spitze eines Glasstäbchens umrührt, so erhält man wie die Photographie 2 zeigt, nach Verdunsten des Wassers grösstenteils keilchenförmige Kristalle. Wenn man von diesem Präparat 0,1 mg Tauben injiziert, die den typischen Krampf zeigen, so lässt der Krampf nach 1 Stunde nach, die auf 38,5°C. gefallene Körpertemperatur steigt alsbald auf 41,6°C. und in 24 Stunden hat sich die Beinparese so weit erholt, dass das Tier frei auf der Stange sitzen kann. Ich habe durch diese Injektion die Tiere noch 13 Tage lang überleben lassen können. Die Aktivität beträgt also 0,1 mg : 13 = 0,007 mg pro Taube und Tag. S.a. Fig. 8.

Wenn 5 mg dieser Rohkristalle in 10 ccm warmem Wasser aufgelöst werden, löst sich nur ein Teil derselben. Nach dem Zentrifugieren habe ich dann wieder mikroskopiert, aber diesmal nur

Fig. 8.

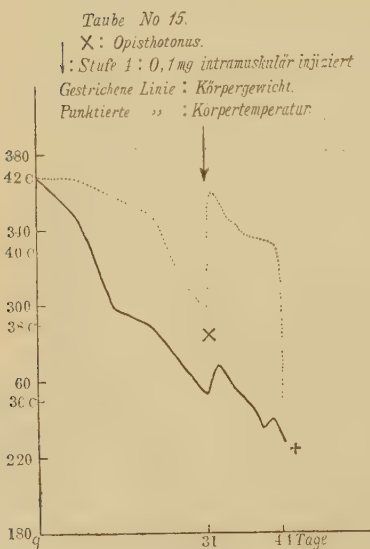
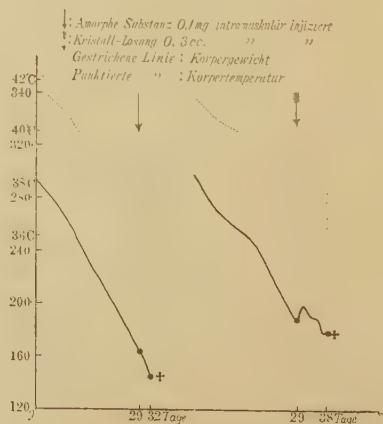


Fig. 9.



amorphe Körnchen und kein einziges Kristall finden können. Das Gewicht betrug 1,352 mg. Es muss also angenommen werden, dass die Kristalle gänzlich aufgelöst worden sind. Um nun festzustellen, welche von den beiden Substanzen, die Kristalle oder die amorphe Substanz die wirksamere ist, habe ich 0,1 mg der amorphen Substanz und von der Kristalllösung 0,3 ccm (ungefähr 0,1 mg entsprechend) Tauben, die beinahe demselben Schwächezustand verfallen waren, injiziert und, wie die Fig. 9 zeigt, dabei befunden, dass die Kristalllösung entschieden die wirksamere ist. Bei weiterer Injektion von 0,2 ccm dieser Kristalllösung in eine Taube mit Krampferscheinungen zeigte es sich, dass der Krampf nach 2 Stunden nachliess, die auf 37,5°C. gefallene Temperatur auf 40,5°C. stieg, und der Vogel am folgenden Tage ganz frei auf der Stange sitzen konnte. Erst 8 Tage später verfiel das Tier wieder in Krampf. S.a. Fig. 10.

Präparat 2.—Von diesem Präparat wurden 19,9 mg (entsprechend etwa 10 kg Reiskeimen) in warmem Wasser von 60°C. aufgelöst, und der unlösliche Rückstand zentrifugiert und entfernt. Auf diese Weise wurden 13,9 mg eines hygroskopischen, gelbbraunen Rückstandes gewonnen. Das mikroskopische Bild (Photogr. 3) zeigt fast nur barrenförmige Kristalle, die denen von Jansen und Donath sehr ähnlich sind. Nach Injektion von

Fig. 10.

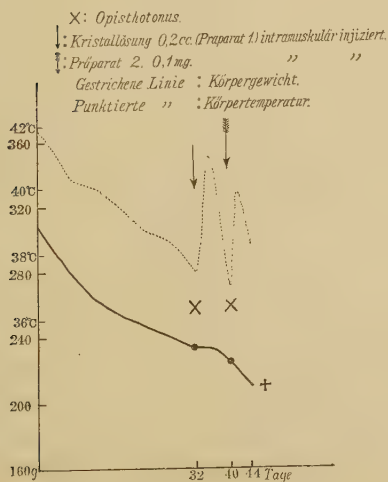
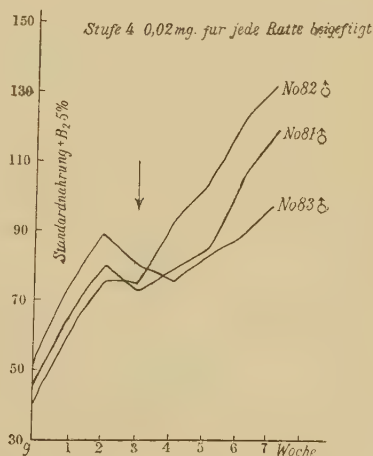


Fig. 11.



0,1 mg dieser Kristalle in Tauben, die bereits zweimal in Krampf verfallen waren, liess der Krampf bereits nach 2 Stunden nach, die auf 37°C. gefallene Körpertemperatur stieg wieder auf 40°C, und das Tier lebte noch 4 Tage. Die Aktivität dieses Präparats beträgt also 0,025 mg pro Taube und Tag, es ist also im Vergleich zum Präparat 1 merklich schwächer. Es ist hierbei noch zu berücksichtigen, dass das Versuchstier in diesem Falle schon zweimal in Krämpfe verfallen, und der Schwächezustand schon sehr weit vorgeschritten war. S.a. Fig. 10.

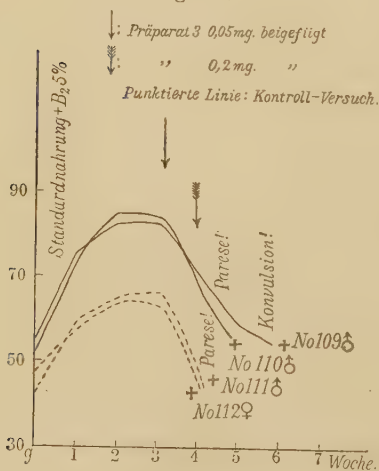
Von dem Präparate 1 habe ich einer jungen Ratte täglich 0,02 mg der Standardnahrung plus B₂ 5% hinzugegeben. Die Resultate sind aus der Fig. 11 ersichtlich. Leider reichte das Material nicht lange genug aus, um die Tiere noch länger beobachten zu können.

Präparat 3.—Das Gewicht betrug 19,6 mg (entsprechend 10 kg Reiskeimen). Das Präparat war ebenfalls zerfliessend. Das mikroskopische Bild (Photogr. 4) zeigt in einer homogenen Grundsubstanz reichlich amorphe Körnchen und Kristalle, die zu Nadelbündeln vereinigt sind. Auf Injektion dieses Präparats in einer Menge von 0,1 mg in eine Taube mit dem typischen Krampf, liess der Krampf nach 2 Stunden nach, und die auf 36,5°C. gefal-

lene Körpertemperatur stieg wieder auf 38,0°C. Das Tier ging am nächsten Morgen ein. Einer jungen Ratte habe ich zu der Standardnahrung plus B₂ 5% täglich 0,05–0,2 mg dieses Präparates zugegeben; sie zeigte aber, wie die Fig. 12 zeigt, kein besseres Wachstum als zuvor.

Präparat 4.—Das Gewicht betrug 23,0 mg. Wie die Photogr. 5 zeigt, besteht dieses Präparat mikroskopisch betrachtet aus reichlich vielen unregelmässigen Kristallen. Von diesem Präparat

Fig. 12.



habe ich selbst mit einer so grossen Dosis wie 0,5 mg den Krampf bei den Tauben nicht kupieren können. Ausser diesem habe ich, allerdings nur in einem Falle, 25,3 mg einer stark zerfliessenden, honigartigen Substanz erhalten, die mikroskopisch gar keine Kristallbildung zeigte. Diese Substanz war auch bei Injektion von 0,5 mg völlig wirkungslos.

Selbst wenn wir als Masstab für die Vitamin-Ausbeute dieser Stufe das Präparat 1 annehmen, so ergibt sich 13,8 mg:0,02 mg gleich 690 Ratteneinheiten, d. h. also nur 3,45%.

Weitere Reinigung:—Nach Jansen und Donath habe ich dann eine Umkristallisierung in absolutem Alkohol-Azeton vorgenommen und die Pikrolonatbildung versucht, da aber mein Material an Menge zu gering war, ging es während des Verfahrens verloren, sodass also diese Versuche zu nichts führten.

b. Bestimmung der Gesamt-Phosphorsäure.

Bevor die Eijkman'sche Theorie (1911) veröffentlicht worden war, galt die Aufmerksamkeit der Forschung der Phosphor-Theorie von Schaumann (1908). Es ist ja diese Theorie auch ganz einleuchtend, wenn man bedenkt, dass in der bei Berri-berri so wirkamen Reiskleie beträchtlich mehr Phosphor enthalten ist, als im polierten Reis. Seitdem aber die Vitamin-Theorie als Ätiologie der Berri-berri-Krankheit sich einbürgerte, hat man den Phosphorsäuregehalt gänzlich beiseite gesetzt. Demgemäss ist auch bei der Herstellung des Vitamin B der Phosphorsäuregehalt fast gänzlich unberücksichtigt geblieben. Aus diesem Grunde habe ich bei der Fraktionierung den Verbleib des in den Reiskeimen in reichlichem Masse vorhandenen Phosphors aufmerksam verfolgt. Die Bestimmung habe ich nach der Methode von Fiske und Subbarow (1925) ausgeführt und habe die Gesamtphosphorsäure als P₂O₅ angegeben.

TABELLE I.

Material	Reiskeime	Original-extrakt	Stufe I	Stufe II (PH: 6,5)	Stufe III	Stufe IV	Stufe V
P ₂ O ₅ (%)	8,0967	1,0527	1,0206	0,6545	+	—	—

Es zeigt sich also, dass mit fortschreitender Fraktionierung der Phosphorgehalt allmählich geringer wird und endlich auf Stufe IV völlig verschwindet. Wir müssen also annehmen, dass zum mindesten in dem Vitamin-Molekül kein Phosphor enthalten ist.

c. Das Polarisationsvermögen.

Ich habe mir die Frage gestellt, ob das Vitamin B₁ optisch aktiv ist oder nicht. In der Literatur habe ich darüber keine Aufklärung finden können. Ich habe die obengenannte Stufe IV vor Zusatz des Platinchlorids zu der Lösung in absolutem Alkohol untersucht, sie optisch aber absolut inaktiv gefunden. Kürzlich hat nun auch Guha (1931) mit Hefepräparaten meinen Untersuchungen entsprechende Bestimmungen angestellt und fand, dass die Lösung in absolutem Alkohol ganz inaktiv war, während das unreinere Präparat einer früheren Stufe nur eine schwach aktivierende Kraft besass. Nach allem haben wir das Vitamin B₁ als optisch inaktiv zu bezeichnen.

d. Die Farbenreaktion.

Als Farbenreaktionen des Vitamin B wurden bisher schon nicht wenige von verschiedener Seite angegeben, eine zuverlässige, spezifische Farbenreaktion aber besitzen wir bis heute eigentlich noch nicht. Es sind im allgemeinen mehr die beigemenigten unreinen Substanzen die färben; je reiner das Präparat wird, um so schwächer wird auch die Farbenreaktion.

1. *Die Pauly'sche Diazo-Reaktion:*—Wie schon erwähnt sollen die Kristalle von Jansen und Donath auf die Pauly'sche Reaktion stark positiv reagieren. Auch Guha und Drummond (1929) berichteten eine derartige starke positive Reaktion ihres Goldpräzipitates. Dagegen beobachtete Kinugasa (1928) an vielen Vitaminfraktionen, dass die Diazo-Reaktion ebenso wie die Folin-Denis I (Harnsäurereaktion) und II (Phenolreaktion)-Reaktionen u. a. analog mit fortschreitender Reinigung der Präparate schwächer werden und schliesslich negativ ausfallen. Kinnersley und Peters (1927) fanden, dass ihr "Torulin" (Aktivität 0,1–0,2 mg) auf die Pauly'sche Reaktion nur sehr

schwach positiv reagierte, und nahmen daher anfangs an, dass das Hefevitamin "Torulin" und die Reisvitamin-Kristalle verschiedene Eigenschaften besitzen. Später verglichen sie dann in Amsterdam hergestellte Reisvitamin-Kristalle mit reinstem "Torulin" unter Benützung der gleichen Mengenverhältnisse und fanden, dass "Torulin" viel stärker reagiere. (Jansen, Kinnersley, Peters und Reader (1930)). Infolgedessen wurde das Hindernis gegen die Annahme, beide Vitamine seien ein und derselbe Stoff, fallen gelassen. Ein solcher Irrtum kann natürlich leicht aufkommen, wenn man bei vergleichenden Versuchen sich nicht derselben Mengenverhältnisse bedient.

2. *Jendrassik'sche Reaktion*:—Auf dem Befund von Abderhalden, Hess u. a., dass die Sauerstoffabsorptionskapazität bei Zusatz von Vitamin B zu einem Gewebspräparat einer polyneuritischen Taube erhöht wurde, hat Jendrassik eine Reduktionskraft des Vitamin B angenommen und entdeckte, dass die Ferri-ferrocyanid-Reaktion als spezifische Farbenreaktion des Vitamin B angesehen werden kann. Indessen haben Bezssonoff (1924), Levine (1924) und Takata (1928) u. a. durch kritische Untersuchungen festgestellt, dass diese Reaktion eine allgemeine Reaktion der Phenolgruppe darstellt. Da bei dieser Reaktion das Verhalten der Phenolgruppe und das Verhalten des Vitamin B sehr nahe verwandt sind, hat Levine behauptet, dass man das Vorhandensein einer oder mehrerer Phenolgruppen im Vitamin-Molekül nicht verneinen könne; zum mindesten hält er das für sehr wahrscheinlich. Takata fand, dass ausser der Phenolgruppe auch die cyclischen Amino-Derivate, manche Purinbasen, Alkaloide und ungesättigte Verbindungen positiv auf diese Reaktion reagieren, und ist der Ansicht, dass, da mit zunehmender Reinheit der Vitamin B-Präparate die Reaktion schwächer wird, und ferner bei Präparaten, die durch Wärme oder Alkali zerstört wurden, die Reaktion gleich stark ausfällt, die positive Reaktion nicht durch das Vitamin B, sondern durch irgendeine beigemischte Purinbase hervorgerufen werde.

3 und 4. *Folin-Denis'sche I und II-Reaktion*:—Diese beiden Reaktionen sollen im allgemeinen durch die dem Vitamin B

anhaftenden Verunreinigungen positiv ausfallen. Mit zunehmender Reinheit des Präparates verschwinden sie schliesslich. Eijkman (1927) hat jedoch mit den Kristallen von Jansen und Donath eine deutlich positive Harnsäurereaktion beobachtet. Ich habe nun meine nach der Methode von Jansen und Donath fraktionierten einzelnen Präparate erst im Trockenzustand hergestellt, davon 1%ige und 0,1%ige Lösungen hergestellt, und dann die obengenannten 4 Reaktionen nachgeprüft. S.a. Tabelle II.

Gegenüber der bisher allgemein verbreiteten Ansicht habe ich bei meinen Präparaten festgestellt, dass bei allen 4 Reaktionen mit der fortschreitenden Fraktionierung die Reaktionsintensität nicht abnimmt. Mir scheint es daher nicht berechtigt, den positiven Ausfall dieser Reaktionen einfach nur auf die dem Vitamin anhaftenden möglichen Beimischungen zurückzuführen.

Die Möglichkeit, dass im Vitamin B-Molekül Stoffe enthalten sind, die eine derartige Farbenreaktion ergeben, ist ganz und garnicht von der Hand zu weisen. Da aber diese Reaktionen sehr empfindlich sind, so können sie natürlich auch durch noch so spärliche Beimengungen in den Präparaten hervorgerufen werden. Wir können daher dem positiven Ausfall dieser Reaktionen fast gar keinen Wert beimessen. Dagegen hat der negative Ausfall dieser Reaktionen schon grösseren Wert. Bei einem negativen Ausfall sämtlicher genannter Reaktionen lässt sich darauf schliessen, dass in dem Präparat kein Vitamin B enthalten ist.

*e. Eine relativ einfache Methode der Darstellung des
klinisch anwendbaren, konzentrierten anti-
neuritischen Vitamins.*

Bei Berri-berri, besonders bei deren akuter Form, ist es von Wichtigkeit, möglichst schnell dem Patienten eine grosse Dosis Vitamin zu applizieren. Bei besonders schweren Fällen hat eine Verabreichung per os kaum mehr die erwünschte Wirkung, sodass wir ein zur intravenösen bzw. subkutanen Injektion geeignetes Präparat erwünschen, in dem in relativ kleinen Mengen ein möglichst grosser Vitamingehalt vorhanden ist. Es frägt sich nun,

TABELLE II.

Material	Reaktion.	Paulysche Reaktion	Jendrassik'sche Reaktion	Folin-Denis'sche Harnsäure-R.	Folin-Denis'sche Phenol-R.
Stufe I.	$\begin{cases} 1 \% \\ 0,1 \% \end{cases}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} ++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} ++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ ++ \end{matrix}$
Stufe II.	$\text{PH: } 4,5 \begin{cases} 1 \% \\ 0,1 \% \end{cases}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ ++ \end{matrix}$	$\begin{matrix} ++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} ++++ \\ ++ \end{matrix}$
	$\text{PH: } 6,5 \begin{cases} 1 \% \\ 0,1 \% \end{cases}$	$\begin{matrix} ++++ \\ ++ \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ ++ \end{matrix}$	$\begin{matrix} + \\ \pm \end{matrix}$	$\begin{matrix} ++++ \\ +++ \end{matrix}$
	$\text{PH: } 8,0 \begin{cases} 1 \% \\ 0,1 \% \end{cases}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} ++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} + \\ \pm \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ ++ \end{matrix}$
Stufe III.	$\begin{cases} 1 \% \\ 0,1 \% \end{cases}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} + \\ \pm \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$
Stufe IV.	$\text{A} \begin{cases} 1 \% \\ 0,1 \% \end{cases}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} + \\ \pm \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$
	$\text{B} \begin{cases} 1 \% \\ 0,1 \% \end{cases}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} + \\ \pm \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$
Stufe V.	$\text{A} \begin{cases} 1 \% \\ 0,1 \% \end{cases}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ ++ \end{matrix}$	$\begin{matrix} + \\ \pm \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ ++ \end{matrix}$
	$\text{B} \begin{cases} 1 \% \\ 0,1 \% \end{cases}$	$\begin{matrix} +++ \\ + \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ ++ \end{matrix}$	$\begin{matrix} + \\ \pm \end{matrix}$	$\begin{matrix} +++ \\ ++ \end{matrix}$

Anmerkungen zu Tabelle II.

1. Stufe 4.A. Das Platinchlorid-Präzipitat wurde abfiltriert, das Filtrat mit SH₂ durchströmt, das entstandene Platinsulfid vollständig entfernt, die restierende klare Flüssigkeit eingetrocknet, und von dem erhaltenen Präparat 1%ige bzw. 0,1%ige wässrige Lösungen hergestellt.

2. Stufe 4.B. Rohkristalle.

3. Stufe 5.A. Der nach Auflösung der Rohkristalle in absolutem Alkohol zurückbleibende unlösliche Rückstand.

4. Stufe 5.B. Das getrocknete alkoholische Filtrat.

ob die Herstellung eines solchen Präparates sich technisch einfach genug und bezügl. der Ausbeute auch einigermaßen lohnend durchführen lässt. Gerade diese Bedingungen sind aber, wie wir gesehen haben, äusserst schwer zu erfüllen. Die von mir ausprobierte, verhältnismässig einfache und praktischen Zwecken angepasste Methode will ich hier im Folgenden beschreiben.

Die oben erwähnte Stufe 1 wird in einer Menge von 150 ccm (entsprechend 2 kg Reiskeimen) auf einen Gesamtsäuregrad von 5% (berechnet auf H_2SO_4) gebracht, und darauf 80–90 ccm einer Lösung von 50%iger Phosphorwolframsäure im 5%iger Schwefelsäure zugegossen und umgerührt. Es entsteht ein grauweissliches Präzipitat in reichlicher Menge. Nach Stehenlassen über Nacht im Refrigerator wird mit der Nutsche abgesogen, der Niederschlag mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen, in einen Mörser genommen, mit einem kleinen Volum Wasser und solidem Baryt in leichtem Überschuss (ungefähr so viel, dass das Gemisch mit Phenolphthalein definitiv rote Farbe zeigt) einige Minuten lang kräftig verrieben und dann sofort mit der Nutsche abfiltriert. Um das Filtrat möglichst schnell anzusäuern, werden vorher in den Filterkolben 15 ccm einer 1 Mol- H_2SO_4 eingebracht. Der Rückstand wird noch zweimal in der vorerwähnten Weise behandelt. Das gewonnene Filtrat wird dann mit gesättigtem Barytwasser neutralisiert, das entstandene Bariumsulfat vollständig entfernt, bei niedriger Temperatur im Vakuum (bis zu $50^\circ\text{C}.$) konzentriert, das inzwischen niedergeschlagene Präzipitat entfernt und weiter im Schwefelsäure-Exsikkator getrocknet.

So wird ein gelblich-brauner, stark hygroskopischer harzartiger Rückstand in einer Menge von 3,06–3,47 g aus 2 kg Reiskeimen erhalten. Wenn man diesen Rückstand im Verhältnis von 2% in Wasser auflöst, erhält man eine klare, gelbbraune, fast neutrale Lösung. Diese 2%ige wässerige Lösung reagiert auf die Pentose- und die Kossel'sche Probe negativ. Die hydrolytische Lösung reduziert Fehling'sche Lösung in leichtem Grade. Die Molisch'sche Reaktion fällt stark positiv, die Millon'sche und Biuret Reaktion schwach positiv, die Pauly'sche, Jendrassik'sche und Folin-Denis'sche Phenolreaktion stark positiv und die Harn-

säure-Reaktion mässig positiv aus. Der Gesamtphosphorsäuregehalt (P_2O_5) beträgt 0,594%, der Gesamtstickstoffgehalt 11,2% und der Amino-N-Gehalt 3,903%.

Aktivität:—Aus Injektion von 2–10 mg dieses Rückstandes in Tauben mit dem typischen Krampf, lässt der Krampf nach 1–2 Stunden nach, am nächsten Tage erfolgt Erholung von der Parese, die Tiere können frei auf der Stange sitzen. Die Dosis pro Tag beträgt durchschnittlich 0,48 mg. S.a. Tabelle 3.

Rattenversuch:—Das Ergebnis bei Hinzufügung von nur 0,02% zur Standardnahrung plus B₂ 5% in den Wachstumsversuchen mit jungen Ratten ist in der Fig. 13 wiedergegeben.

Unter der Voraussetzung, dass wenn eine junge Ratte täglich 10 g Nahrung aufnimmt, die aufgenommene Vitamin-Menge 2 mg betragen

Fig. 13.

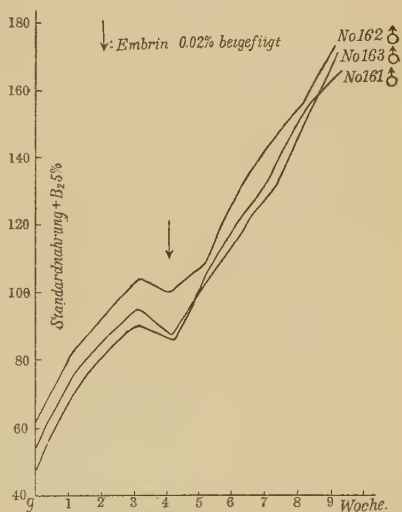


TABELLE III.

Taube Nr.	Injizierte Dosis mg	Lebte noch Tage	Dosis pro Tag mg
55	10	23	0,43
60	6	15	0,4
67	2	4	0,5
69	3	5	0,6
Durchschnitt			0,48 mg

soll, sind zum normalen Wachstum der jungen Ratte, wie w. o.

erwähnt, täglich 0,5 g Reiskeime notwendig. Es sind also in 2 kg Reiskeimen 4,000 Ratteneinheiten an Vitamin enthalten; andererseits sollten in diesem Präparate nur $3,2 \text{ g} : 2 \text{ mg} = 1,600$ Ratteneinheiten enthalten sein; d. h. also nur 40% des in dem Ausgangsmaterial enthaltenen Vitamins sind in dieses Präparat übergegangen. Die Wirkung ist aber $2 \text{ mg} : 0,5 \text{ g}$, d. h. also 250 fach verstärkt.

Bei der Taube beträgt die Dosis ca. 0,5 mg pro Taube und Tag. Wenn wir nun voraussetzen, dass das Körpergewicht der Taube bei Eintreten der Krämpfe 200 g beträgt und beim Menschen bei Berri-berri-Anfällen 60 kg, so müssten für den letzteren als therapeutische Tagesdosis $0,5 \text{ mg} \times 300 = 0,15 \text{ g}$ ausreichend sein.

Nach subkutaner Injektion dieses Präparates in 5%iger Lösung (isotonischer Kochsalzlösung) wird zuweilen über Schmerzen geklagt. Die 1–2%ige Lösung ist fast reaktionslos. Diese habe ich "Embrin" genannt.

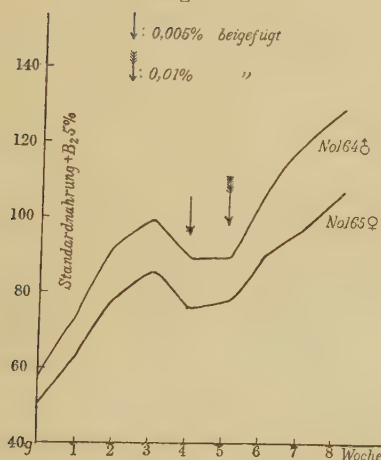
Weitere Konzentration:—Das vorhergehende Präparat wurde in einer Menge von 1,0 g in 250 ccm absolutem Alkohol aufgelöst, bei 60°C. 3 Stunden lang extrahiert, der unlösliche Rückstand (0,42 g) entfernt, und in das leicht strohgelbe alkoholische Filtrat ca. 3 ccm einer 5%igen Lösung von Platinchlorid in absolutem Alkohol eingegossen. Dann wird umgerührt, nach 24 Stunden durch ein Glasfilter filtriert, der Rückstand in wässriger HCl suspendiert (wobei er sich grösstenteils auflöst), genügend Schwefelwasserstoff hindurchgetrieben, und wieder eine Nacht im Refrigerator stehen gelassen. Am nächsten Tage wird dann das sedimentierte Platinsulfid entfernt, das klare Filtrat auf dem Wasserbade konzentriert, dazwischen wieder das Platinsulfid ausgefällt, und das schliesslich ganz klare Filtrat weiter im Natronkalk-Exsikkator getrocknet. Es verbleiben schliesslich etwa 100 mg einer sehr hygroskopischen, honigartigen Substanz. Unter dem Mikroskop sieht man dann, wie die Photographie 6 zeigt, eine reichliche Beimischung stäbchenartiger Kristalle.

Taubenversuch:—Die Ergebnisse zeigt die Tabelle IV.

TABELLE IV.

Taube Nr.	Injizierte Dosis mg	Lebte noch Tage	Dosis pro Tag mg
58	2,0	6	0,33
65	1,0	5	0,2
72	0,5	3	0,16
Durchschnitt			0,23 mg

Fig. 14.



Rattenversuch:— Ich habe der Standardnahrung plus Vitamin B₂ 5% zunächst 0,005% dieses Präparates zugesetzt. Das Körpergewicht blieb fast stationär; dann erhöhte ich die Dosis auf 0,01%, worauf ein leidlich normales Wachstum erzielt wurde. S.a. Fig. 14.

Die Ausbeute beträgt 100 mg: 1 g, d.i. 10%, die Wirkung wird aber nur verdoppelt, daher ist dieses Präparat als praktisch nicht verwendbar anzusehen.

Amylalkohol-Extraktion:—

1,0 g "Embrin" wurden in 20 ccm Wasser aufgelöst und dann nach Sera und Okada (1929) mit dem zweifachen Volumen Amylalkohol mehrfach extrahiert. Dann wurde der gesamte Amylalkohol unter dem Vakuum destilliert. Nach Einengen auf etwa 20 ccm fällt ein gelblich-weißer, flockiger Niederschlag aus, der zentrifugiert, einmal mit Äther gewaschen und im Chlorkalk-Exsikkator getrocknet wird. So werden 0,04 g eines grauweißen Pulvers erhalten. Die Ausbeute beträgt also nur 4%. In 1%iger wässriger Lösung erhält man relativ viel unlöslichen Rückstand. Durch Injektion von 5–10 mg im Suspensionszustand wird der Krampf von Tauben nur leidlich kupiert, eine vollständige Beseitigung der Beinparese ist nicht zu erreichen.

TABELLE V.

Taube Nr.	Injizierte Dosis mg	Lebte noch Tage	Dosis pro Tag mg
75	10	3	3,3
76	5	4	1,25

Nach den Berichten von Jansen und Donath soll sich das Vitamin aus der Methylalkohollösung auf Zusatz von Amylalkohol ebenso wie beim Zusatz von Äther, Chloroform, Petroläther, Benzol usw. auskristallisieren lassen. Es scheint mir, dass das Vitamin B₁ selbst durch derartige fettlösende Mittel nicht gelöst werden kann.

f. Ein einfaches Konzentrationsverfahren.

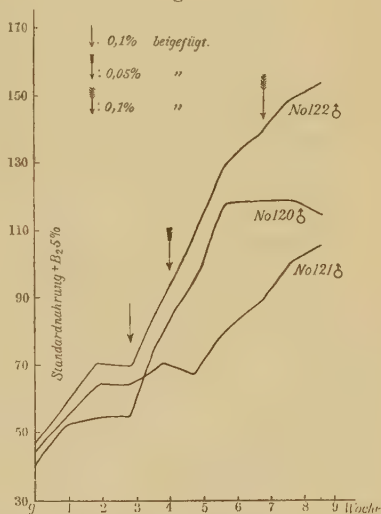
150 ccm der w.o. erwähnten Stufe 1 (entsprechend 2 kg Reis-keimen) wurden mit gesättigtem Barytwasser neutralisiert, das entstandene Bariumsulfat vollständig entfernt, dem klaren Filtrat weiter gesättigtes Barytwasser in leichtem Überschuss zugesetzt und nach der Alkalisierung (so dass Phenolphthalein deutlich die rote Farbe zeigt) ungefähr das 10 fache Volum an Methylalkohol bzw. Azeton hinzugefügt. Nach gründlichem Umrühren erhält man einen gelbbraunen, flockigen Niederschlag in reichlicher Menge. Wenn man nun diesen Niederschlag im Schwefelsäure-Exsikkator trocknet, so erhält man 3,472–3,836 g eines nicht hygroskopischen, bräunlichgelben Pulvers, das sich in 1%iger wässriger Lösung nicht vollkommen klar löst. Reaktionen: Folin-Denis'sche Harnsäurereaktion (+), Phenolreaktion (++), Jendrassik'sche Reaktion (++) und Pauly'sche Reaktion (++) . Die hydrolysierte Lösung hat auf die Fehling'sche Lösung eine leicht reduzierende Kraft. Die Millon'sche Reaktion fällt schwach positiv aus. Gesamtphosphorsäuregehalt (P₂O₅), 0,6087%, Gesamtstickstoffgehalt 6,16%. Bei Behandlung von 2,0 g dieses Präparats mit 1 Mol. Schwefelsäure, Entfernung des entstandenen Bariumsulfats und Trocknung bleibt ein Rückstand von 1,2226 g. Es beträgt demgemäss der Vitamingehalt dieses Präparats ca. 38,8%.

Bei Hinzufügung von 0,05–0,1% dieses Präparates zu der Standardnahrung plus 5% Vitamin B₂ erhielt ich an Ratten das in Fig. 15 wiedergegebene Resultat.

g. Absorptionsspektrum.

Forschungen über das Absorptionsspektrum des Vitamin B₁ sind noch sehr selten. Damianovich beobachtete bei Bierhefe-Extrakt ein 248–260 μ . Absorptionsband. Mukherji (1929) fand bei dem nach der Jansen-Donath'schen Methode hergestellten Reisvitaminkristall ein deutliches Absorptionsband von 390–330 μ . Vor kurzem fand Guha (1931), dass das durch seine elektrodialytische Hefefraktion gewonnene Präparat eine starke Absorption im Gebiete von 260 μ . zeigte, das wirksamere Drummond'sche konzentrierte Reisvitamin hingegen nicht. Dazu fand er, dass das von Mukherji beobachtete Band bei diesen beiden Präparaten nicht so deutlich war. Andererseits haben Dixon und Keilin aus Bäckerhefe bei Fraktionieren des Cytochrom das Absorptionsband des dabei durch Sulfurdioxyd-Behandlung gebildeten Proteinpräzipitats im Gebiete von 260 μ . gefunden und diese Tatsache Guha persönlich mitgeteilt. Guha hat darauf die Wirkung dieses Proteinpräzipitats mit der des Vitamin B₁ verglichen und es als absolut inaktiv befunden, weshalb er annimmt, dass dieses Band für das Vitamin B₁ ganz unspezifisch ist. Und wenn ferner, wie Jansen und Donath vermuten, das Vitamin B₁ ein Glyoxalinderivat ist, dann kann es sich wohl nicht um ein selektives Absorptionsband handeln, wie die Beobachtungen von Marchlewski und Nowotnowna bei dem von ihnen gefundenen Histidin indizieren. Jedenfalls wird angenommen, dass durch spektralanalytische Forschungen keine grossen Fortschritte auf

Fig. 15.



diesem Gebiete gemacht werden können.

Ich habe nun das "Embrin" in einer Menge von 1,0 g in 300 ccm absolutem Alkohol aufgelöst, bei 60°C. 3 Stunden lang extrahiert, den unlöslichen Rückstand entfernt und in dem Filtrat das Absorptionsspektrum bestimmt. Als Kontrolle habe ich den zur Auflösung des Embrins benützten absoluten Alkohol und das ganz wirkungslose alkoholische Filtrat nach der vollständigen Adsorption des Embrins durch eine grosse Menge "Norite" benützt.

Der von mir verwendete Apparat war ein Quarzspektrograph (Modell B) nach Fuess. Die Lichtquelle bestand in einem Entladungsröhr mit Wasserstoff nach E. Lau. Expositionszeit 1 Minute. S.a. die Photographien 7, 8 und 9. Auf den Kontrollbildern 8 und 9 ist ein beachtenswertes Band nicht festzustellen. Dagegen zeigt die Photographie 7 zwischen 360–310 $\mu\mu$. und 280–250 $\mu\mu$. deutliche Bänder, von welchen das erstere dem Mukherji'schen und das letztere dem Damianovich'schen Bande entspricht. Höchst interessant ist, dass diese beiden Bänder bei "Norite"-Behandlung vollständig verschwinden.

Ich nehme im Gegensatz zu Guha als zu mindestens fraglich an, ob nicht in dem Vitamin-B₁-Molekül irgendein Kern enthalten ist, der ein solch selektives Band darbietet. Aber es handelt sich dabei natürlich auch nur um eine Vermutung.

III. ZUSAMMENFASSUNG.

Es ist mir gelungen aus Reiskeimen als Ausgangsmaterial ein Rohkristall zu gewinnen, das bereits in einer Dosis von 0,007 mg pro Taube und Tag, bzw. 0,02 mg Ratteneinheit seine volle Wirkung entfaltet. Die Form der Kristalle ist grösstenteils stäbchenförmig, ab und zu kommen aber auch unregelmässige Kristalle vor. Nur in einem Falle habe ich eine ganz inaktive, amorphe Substanz erhalten.

Über Darstellung des "Torulin" sagte Peters wie folgend: (Kinnersley und Peters 1928) "Up to the stage 0,15–0,3 mg the results can be considered to be reproducible. Beyond the stage of 0,1 mg, we have not defined the technique with the same success." Williams, Waterman und Gurin (1930) ist es nur zweimal

gelungen ein kristallinisches Präparat darzustellen, dessen Wirkungskraft nur 1/3 der der Kristalle von Jansen und Donath betrug. Die Ausbeute an Kristallen war bei meinen Versuchen spärlich, weshalb mir eine weitere Reinigung nicht gelungen ist. Es ist mir auch aus diesem Grunde nicht möglich, auf die von Jansen und Donath aufgeworfenen Frage der chemischen Natur des Vitamin B₁ einzugehen. Dass auch die Kristalle der oben genannten Forscher noch nicht chemisch rein sind, ergibt sich aus der eingangs gegebenen Besprechung der Literatur, wobei noch zu berücksichtigen ist, dass diese Kristalle grösstenteils auch noch B₄ enthalten. (Jansen, Kinnersley, Peters und Reader 1930). Demgemäss ist die Formel C₆H₁₀ON₂ zum mindesten fraglich. Und doch sind diese Kristalle die bis heute am besten wirkenden, also auch reinsten. Auch Kinnersley und Peters (1930) und Guha (1931) haben diese Methode nachgeahmt, und so aus Bierhefe ein höchst wirksames Präparat hergestellt. Insbesondere haben Kinnersley und Peters behauptet, dass das von ihnen isolierte reinste Torulin grösstenteils aus Kristallen besteht. Es wird nicht lange dauern, bis die chemische Natur dieser Kristalle aufgeklärt wird, wenn sie wirklich chemisch rein sein sollten.

Im allgemeinen ist die bisher beobachtete Farbenreaktion nicht auf das Vitamin B₁ selbst, sondern auf die Beimengungen zurückzuführen. Aber nach den Ergebnissen der Untersuchungen von Jansen und Donath, Eijkman, Guha und Drummond, Levine u.a.m. sowie nach den Ergebnissen meiner eigenen Untersuchungen zu urteilen, ist es zum mindesten wahrscheinlich, dass ein auf die oben genannten 4 Reaktionen positiv reagierendes Radikal in dem Vitamin B₁ vorhanden ist. Da aber diese Reaktionen sehr empfindlich sind und schon durch minimale Verunreinigungen hervorgerufen werden können, ist es uns unmöglich, sie als für das Vitamin B₁ spezifisch anzusehen. Wenn diese Reaktionen aber negativ ausfallen, geben sie uns jedoch immerhin einen Anhalt.

Die bisher im Handel feilgebotenen Vitamin B-Präparate haben nur einen geringen Vitamin-Gehalt und haben nur geringen therapeutischen Wert. Ich habe aus Reiskeimen ein Präparat her-

gestellt, das schon in einer Dosis von 0,48 mg pro Taube und Tag bzw. 0,02 mg Ratteneinheit wirkt, und das verhältnismässig ökonomisch sich herstellen lässt. Therapeutisch genügt es, 0,15 g d. i. 3,0 ccm einer 5%igen Lösung als Dosis anzuwenden.

Die Forschungen über das Absorptionsspektrum des Vitamin B₁ sind bis heute noch höchst selten. In der Literatur finden sich darüber nur 2–3 Berichte. Meine Untersuchungen auf diesem Gebiete haben höchst interessante Ergebnisse gezeitigt: ich glaube aber, dass auf diesem Gebiete noch viel Raum zu weiteren Forschungen vorhanden ist.

IV. SCHLUSSÄTZE.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen fasse ich kurz wie folgt zusammen:

1. Es ist mir gelungen, ein Rohkristall darzustellen, das in einer Menge von 0,007 mg pro Taube und Tag bzw. 0,02 mg Ratteneinheit seine volle Wirkung entfaltet.

2. Bei diesem Präparat nimmt die Reaktionsstärke selbst bei fortschreitender Fraktionierung nicht ab, wie die Prüfungen mit der Pauly'schen, der Jendrassik'schen und der I. und II. Folin-Denis'schen Reaktion ergeben haben.

3. Im Vitamin B₁ ist kein Phosphor enthalten. Das Vitamin B₁ selbst ist optisch inaktiv.

4. Ich habe eine für praktische Zwecke relativ einfache Methode gefunden, aus Reiskeimen ein Präparat herzustellen, das schon in einer Dosis von 0,15 g den therapeutischen Zweck erreicht.

5. Ich habe die relativ konzentrierte Lösung von Vitamin B₁ in absolutem Alkohol spektrographisch untersucht und gefunden, dass 2 Absorptionsbänder von 360–310 μ u. und von 280–250 μ u. zu beobachten sind.

Zu diesem Thema hat mich mein hochverehrter Lehrer, Herr Prof. Dr. K. Kodama veranlasst und mich bei meinen Untersuchungen geleitet. Ich bin meinem Lehrer für seine Leitung und den mir stets bereitwilligst erteilten Rat zu grossem Danke verpflichtet.

Dank schulde ich ferner auch Herrn Prof. Dr. H. Takeya und

Herrn Prof. Dr. H. Nishi, der mir bei der Untersuchung des Absorptionsspektrums in gütiger Weise zu Hilfe war.

LITERATUR.

- Bezssonoff (1924): Bull. Soc. Chim., **6**, 35.
 Eijkman (1911): Arch. Schiffs.-Trop. Hyg., **15**, 698.
 Eijkman (1927): Proc. K. Akad. Wetensch. Amsterdam, **30**, 376.
 Fiske und Subbarow (1925): J. Biol. Chem., **66**, 375.
 Fridericia und Mitarbeiter (1928): J. Hyg., **27**, 70.
 Guha (1931): Biochem. J., **25**, 931.
 Guha und Drummond (1929): Biochem. J., **23**, 880.
 Jansen und Donath (1926): Mededeelingen van den Dienst der Volksgezondheid in Ned. Indie Part I. (Reprint).
 Jansen, Kinnersley, Peters und Reader (1930): Biochem. J., **24**, 1824.
 Jendrassik (1923): J. Biol. Chem., **57**, 129.
 Kinnersley und Peters (1927): Biochem. J., **21**, 777.
 Kinnersley und Peters (1928): Biochem. J., **22**, 419.
 Kinnersley und Peters (1930): Biochem. J., **24**, 1856.
 Kinnersley, Peters und Reader (1928): Biochem. J., **22**, 276.
 Kinugasa (1928): Bull. Imperial Hyg. Lab., **32**, 1. (Reprint).
 Levine (1924): J. Biol. Chem., **62**, 157.
 McCollum und Davis (1915): J. Biol. Chem., **21**, 179.
 Mukherji (1929): Indian med. Gaz., **64**, 443.
 Salmon, Guerrand und Hays (1928): J. Biol. Chem., **76**, 487.
 Schaumann (1908): Arch. Schiffs.-Trop Hyg., **12**, 37.
 Sera und Okada (1929): Osaka-Igakkaï-Zasshi, **23**, 12.
 Shimazono (1920): Nippon-Naikagakkai Zasshi, **8**, 182.
 Steenbock, Sell und Nelson (1923): J. Biol. Chem., **55**, 399.
 Takata (1928): Report Imperial Government Inst. Nutrition **2**, 236.
 Williams, Waterman und Gurin (1930): J. Biol. Chem., **87**, 559.

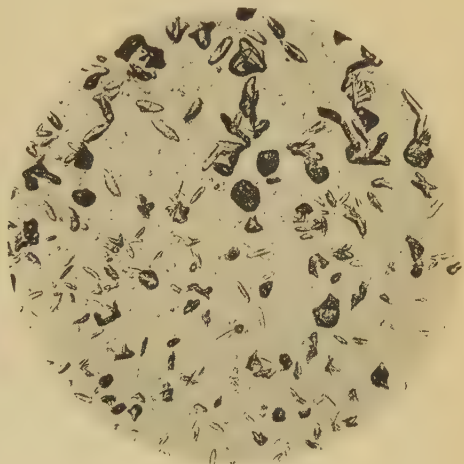
Erläuterungen.

Photographie	1.	Präparat	1.	50 × Vergrößerung
„	2.	„	1.	70 × „
„	3.	„	2.	76 × „
„	4.	„	3.	120 × „
„	5.	„	4.	120 × „
„	6.	„	5.	180 × „
„	7.	Absorptionsspektrum von "Embrin."		
„	8.	„ von absolutem Alkohol.		
„	9.	„ vom absoluten alkoholischen Filtrat.		

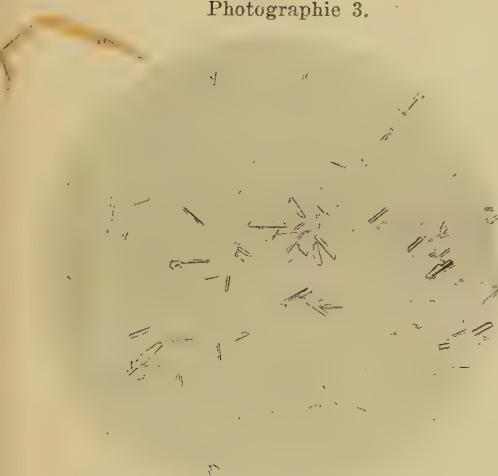
Photographie 1.



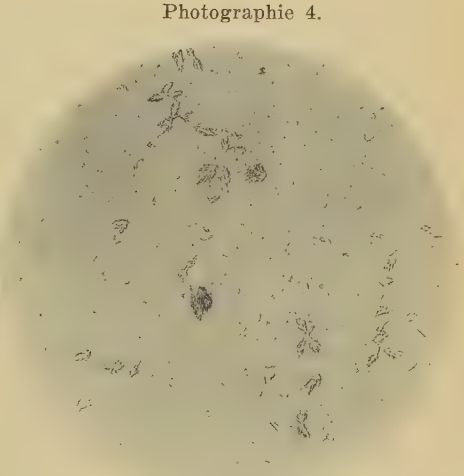
Photographie 2.



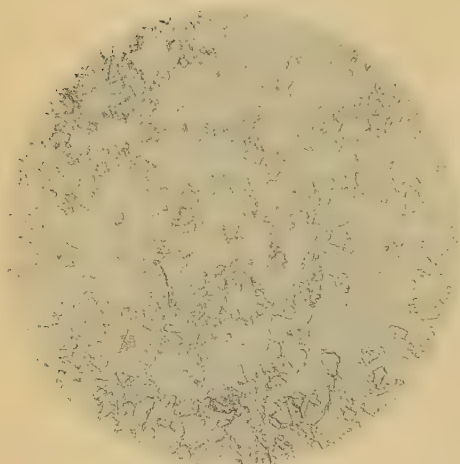
Photographie 3.



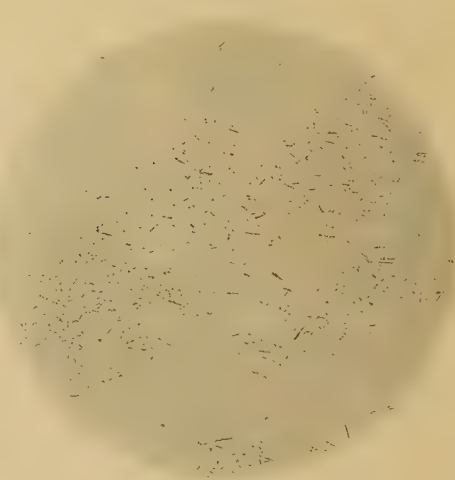
Photographie 4.



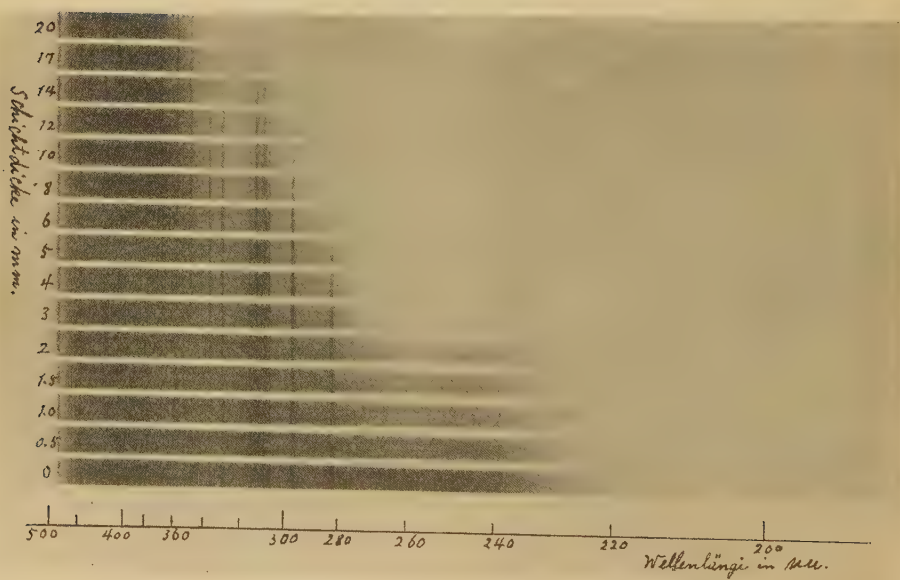
Photographie 5.



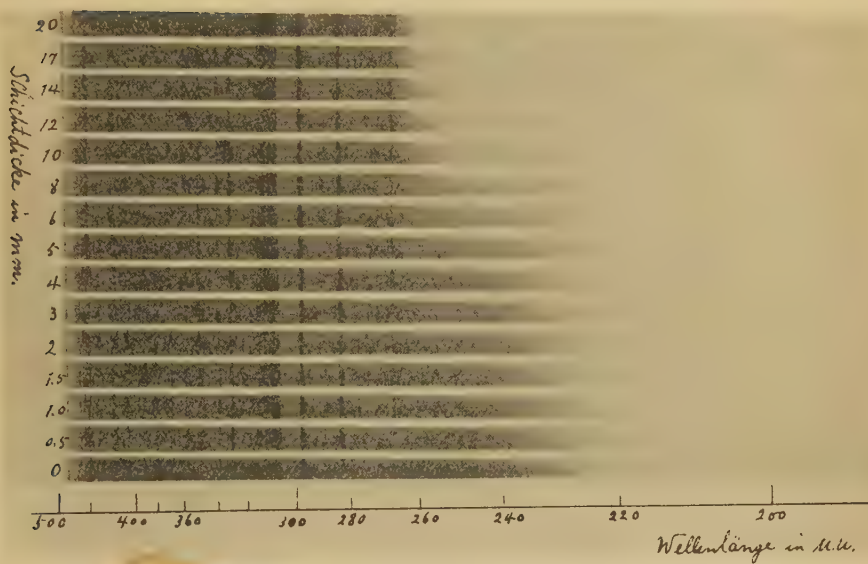
Photographie 6.



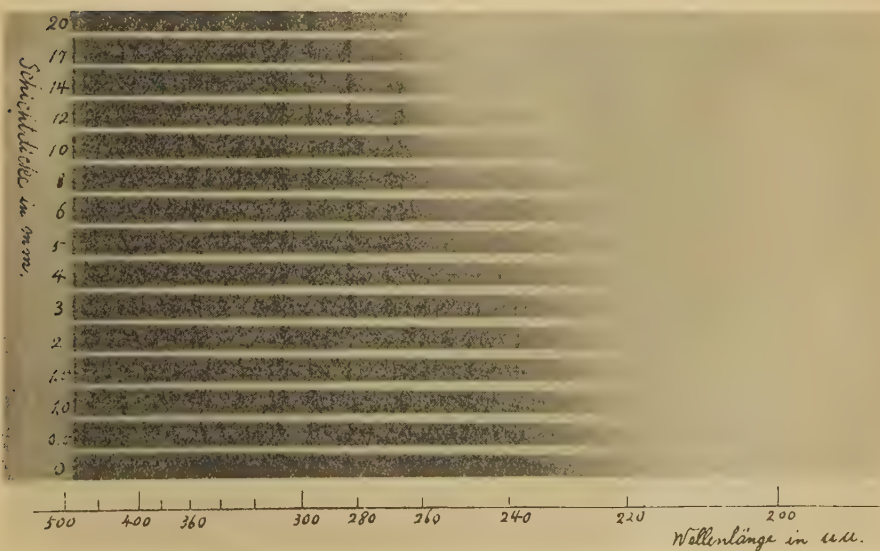
Photographie 7.



Photographie 8.



Photographie 9.



STUDIES ON BIOLOGICAL REDUCTION.

I. A Preliminary Note on the Chemical Nature of an Active H_2 -donator from Heart Muscle.

By

K. KODAMA.

(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University, Fukuoka.)

(Received for publication, February 20, 1932)

It is a well known fact that various tissues of living organisms exhibit a fairly strong reducing tendency when the oxygen supply is stopped. In this concern Okayama (1931) also presented an experimental verification from electropotential study. But it remains still an open question what chemical systems are responsible for this reduction. One might say that in the muscle tissue the sulfhydryl compounds and succinic acid are active agents. But we lack the quantitative evidence that covers the whole of the reducing activity in its capacity as well as in its intensity. A simple experiment will justify this postulation. Namely, when muscle is washed thoroughly with water its reducing activity will be abandoned, but it is restored by the addition of the wash water. Since the wash water itself does not show any reduction and the reaction for sulfhydryl radical becomes negligible by aeration, this restoration should not be ascribed to-SH compounds. The existence of the succinic acid in the wash water is so minute, if any, that its real involvement in the reducing activity of the animal tissue can be neglected.

The author attempted, therefore, to investigate what chemical substances are really concerned in this activity and, working on beef heart muscle, came to the result that at least a compound with approximate composition of hexosemonophosphate is most reactive as H_2 -donator for the muscle dehydrogenase. Whether this substance is identical with lactacidogen i. e. glucosemonophosphate of Embden or not can not be answered with confidence, because the preparate isolated after the method of Embden and Zimmer-

mann (1927) proved to be inactive. It may be possible, however, that the author's prepareate is a mixture of lactacidogen and certain cozymaselike substance, as it gives a strong orcin reaction for pentose. According to the recent works of Lohmann (1929), Euler and Myrbäck (1931) cozymase is assumed to be a compound of adenyolphosphate. It may be possible, therefore, that the pentose reaction of the author's preparation might be due to this contamination. But this is postulated with reservation, because the prepareate seems to contain no nitrogen and moreover, the quantitative determination of pentose by Hoffmann's method (1927) gives only a trace of it. In these lines more intimate studies are now going on in this laboratory, and will be published in the near future. For the present, the author wants to call this active substance „biozucker“, simply for the convenience of later work in this laboratory.

EXPERIMENTS.

1. *Muscle dehydrogenase preparation.*

Since heart muscle showed the strongest activity of dehydrogenase when tested with methylenblue technique of Thunberg, this was used throughout the experiment as the emzym prepareate. The fresh beef heart muscle was minced by chopping machine and washed thoroughly with water until it indicated no reduction of methylenblue at least within one hour. Then it was preserved in 50% glycerin and kept in the refrigerator. In this condition the dehydrogenase activity does not deteriorate for two weeks. For use a few fragments of the muscle were squeezed between filter papers and weighed. Then this was made into paste with sea sand in the mortar and a sufficient amount of M/15 phosphate buffer (pH 7.3) was added so as to make 10% suspension of the muscle. This should be prepared fresh every time before use.

2. *Extraction of active H₂-donator from beef heart muscle.*

After many trials the following method was found suitable. Fresh beef heart muscle was minced by the chopping machine and

extracted by 70% alcohol in the proportion of 1 liter for 1 kg of meat. The whole was mixed well and heated in a boiling water bath for 30 minutes. Filtered through filter paper.

Saturated HgCl_2 solution was added drop by drop to the filtrate under efficient stirring. The precipitate was filtered off. The filtrate was deprived of excess of HgCl_2 by H_2S and the latter by aeration. Then the volume was reduced to one tenth under diminished pressure. It was neutralised with saturated baryt.

The precipitate, which was less active, was filtered off. To the filtrate two volumes of 95% alcohol were added, upon which a flocky white precipitate resulted. This was collected on a hard filter paper and made into powder by treating with absolute alcohol followed by ether. 1 cc. of the solution containing 0.215 gm in 25 cc. of water gave the reduction time of 1'45" when tested with 1 cc. of the muscle preparation and 1 cc. of M/5000 methylenblue in the Thunberg's tube.

3. *Chemical properties.*

a). The elemental analysis gave the following value (average of 3 determination). The data for hexosemonophosphate were put together for comparison.

	O	H	P	Ba
Found,	18.9%	4.5%	7.7%	36.4%
Calculated (for $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_9\text{PBa}$)	18.7	3.36	7.84	34.6

b). With phenylhydrazin the substance gives well defined crystall. The preparation recrystallised from alcohol and chloroform gave the melting point of 138°C .

c). The orcin test was positive, but the quantitative determination by the method of Hoffmann gave only one percent of pentose content; namely 0.3814 gm. gave 3.03 mg pentose.

d). On 0.5 gm. of this substance N-content was determined by Kjeldahl, but its presence was negative.

e). 0.5 gm. of this substance contains 117.5 mg of sugar by the Bertrand's method and 119.8 mg by the Willstätter and Schudeli's. Since the latter method is specific for glucose nearly

all of the sugar found in the molecule of biozucker exists as glucose but not as fructose.

f). The specific rotation of the Ba-salt of biozucker gives the following value

$$[\alpha]_D^{20} = +7.82^\circ$$

REFERENCES.

- Euler and Myrbäck (1931): *Z. für Physiol. Chem.*, **203**, 149.
Hoffmann, W. S. (1927): *Jl. of Biolog. chem.*, **73**, 15.
Lohmann (1929): *Die Naturwissenschaften*, 17 Jg., 624.
Okuyama (1931): *Jl. of Biochemistry*, (Japan), **14**, 69.

STUDIES ON BIOLOGICAL REDUCTION.

II. Distribution of Biozucker-dehydrogenase in Various Tissues, with Special Reference to the Coenzymatic Action of the Extract of Suprarenal Cortex.

By

MINORU TSUKANO.

(From The Laboratory of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University, Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, February 20, 1932)

As the anaerobic breakdown of carbohydrate is believed to be the normal process in cell metabolism, the assumption may be justified, that biosugar dehydrogenase plays an important role in the chemismus involved. It is interesting, therefore, to investigate the distribution of this enzym in various organs, and if possible, to elucidate the correlation of each organ in the metabolism of carbohydrate.

I. DISTRIBUTION OF THE BIOZUCKER DEHYDROGENASE IN VARIOUS ORGANS.

Various beef organs as given in the text were examined. They were brought to the laboratory from the slaughter-house as soon as possible. A portion of each organ was weighed, cut into small pieces, washed thoroughly with water, then made into paste in a mortar and added with M/15 phosphate buffer (pH=7.38) to become 10 percentage of the emulsion. In some instances rabbit organ was used.

As donator 2 percent watery solution of biozucker(Ba-salt) was used and for the sake of comparison M/20 sodium succinate solution was also tested.

To determine the dehydrogenase activity the methylenblue reduction method was applied.

Into the vacuum-tube of Thunberg were introduced 1.0 cc.

of 10.0 percent tissue emulsion, 0.4 cc. of M/5000 methylenblue solution and 0.4 cc. of biozucker or M/20 sodium succinate solution.

After being evacuated for 2 minutes at the pressure of 2 mm. of mercury by vacuum-pump the tube was placed in a thermostat kept at 37°C. and the time of decolorization was measured. To represent the activity of the ferment the value:

$$\frac{1}{\text{time in minute}} \times 100 \text{ was used.}$$

The results are summarised in Table I.

TABLE I.

The activity of biozucker- or succinodehydrogenase in various organs of ox or rabbit.

Organs	Biozucker dehydrogenase		Succinodehydrogenase	
	Decolori- zation time in minute	Activity	Decolori- zation time in minute	Activity
Cortex of adrenal gland	1	100.0	9	11.1
Medulla of adrenal gland	6	16.6	15	6.6
Heart	2	50.0	4	25.0
Cortex of kidney	4	25.0	4	25.0
Medulla of kidney	14	7.1	9	11.1
White muscle	8	12.5	18	5.5
Red muscle	9	11.1	17	5.8
Liver	9	11.1	8	12.5
Cortical substance of cerebrum	9	11.1	13	7.6
White substance of cerebrum	19	5.2	20	5.0
Spleen	27	3.7	33	3.0
Pancreas	20	5.0	23	4.3
Lung	30	3.3	61	1.6
Thyroid gland	45	2.2	60	1.6
Testicle	65	1.5	>65	<1.5
Uterus	70	1.4	>70	<1.4

It is apparent from the above table, that the cortex of suprarenal gland exhibits the strongest activity of biozucker dehydrogenase, though this is not the case with succinodehydrogenase.

The argument that both enzymes are the same can be denied by this difference in their distributions in various organs.

II. INFLUENCE OF THE EXTRACT OF THE SUPRARENAL CORTEX ON THE ACTION OF BIOZUCKER DEHYDROGENASE.

The enormous activity of the suprarenal cortex, as above proved, is exceedingly interesting, for this hormonal organ may play an important part in the metabolism of carbohydrate in the animal body.

We investigated, therefore, to decide, whether or not this function of the cortex is due to the high contents of the ferment or the presence of some other factor which acts as coenzymatic to accelerate the reaction.

As the first approach to this problem the following extraction was performed and at each stage of the extraction the activity of the extract was determined by methylenblue method of Thunberg. Namely, into the vacuum-tube were introduced 1.0 cc. of the suprarenal tissue emulsion, 1.0 cc. of M/5000 methylenblue solution, 0.5 cc. of the 2 percent biozucker solution and 1.0 cc. of the extract under investigation. After being completely evacuated, the decolorization time was measured at 37°C.

The suprarenal tissue emulsion here used was prepared by washing the tissue with water thoroughly until it no longer reduced methylenblue when used alone in the above procedure in a state of 1–3 percent emulsion with phosphate buffer(pH = 7.38).

Extraction of suprarenal cortex.

The cortical portion of fresh beef suprarenal gland was cut into pieces and boiled with equal volume of water for half an hour. The heat-coagulated substances were filtered off and the filtrate was neutralised with dilute NaOH solution. This extract gives the following result (Table II).

TABLE II.

	Decolorization time	
	1% tissue-emulsion	3% tissue-emulsion
Biozucker alone	16'	4' 30"
Suprarenal extract alone	55'	13'
Biosugar + suprarenal extract	9'	2'

From this result it is clear, that the extract contains an accelerating factor for biozucker dehydrogenase.

For the further purification of this substance, the above extract was mixed with half volume of chloroform in order to dissolve off cholesterin and other fatty matter. After being thoroughly shaken the chloroform was separated by centrifugalising. The procedure was repeated usually three times, upon which the extract became almost clear. To this $\frac{1}{4}$ volume of 25 percent trichloroacetic acid was added. The precipitate was filtered off. The filtrate was neutralised with NaOH and mixed with absolute alcohol as to make the end-concentration of the latter 90 percent. After letting the mixture stand for one hour, the precipitate was separated by centrifuge, treated with absolute alcohol and ether and made into powder in the usual manner.

This watery solution of 0.5 percent was tested for its activity as described. The result is shown in Table III.

TABLE III.

	Decolorization time	
	3% tissue-emulsion	4% tissue-emulsion
Biozucker alone	7'	7'
The extract alone	>90'	>90'
Biosugar + the extract	3'	2'

From the foregoing experiment it is obvious, that the suprarenal cortex contains a substance, which itself does not reduce methylenblue but promotes the action of biozucker as donator. Therefore this substance may be called codonator.

In this concern reference may be made to the work of H. v. Euler and his coworker (1928), that hexosephosphate could be a good donator for muscle dehydrogenase only in the presence of cozymase, which is the essential substance for the yeast fermentation. Quite recently the evidence was raised by Lohmann (1929) that the cozymase is nothing but the adenylypyrophosphate. Deuticke (1930) has also proved that a dehydrogenase from the jute plant can oxidise the hexosephosphate with cooperation of adenylytriphosphate isolated from muscle by Fiske.

The codonator nature of the suprarenal extract is also true toward hexosediphosphate as donator. As a sample of hexosediphosphate, 1.0 percent suspension of candiolin was used in the next experiment.

The procedure was quite the same as in the foregoing experiment.

TABLE IV.

	Decolorization time
1% candiolin alone	>90'
0.5% suprarenal extract alone	>90'
1% candiolin + 0.5% suprarenal extract	5'

The same experiment was repeated with the ferment in heart muscle instead of the suprarenal tissue. The result is given in Table V.

TABLE V.

	Decolorization time
1% candiolin alone	>90'
0.5% suprarenal extract alone	>90'
1% candiolin + 0.5% suprarenal extract	5'

It is apparent from the above experimental result, that the suprarenal extract is quite active as codonator for candiolin.

Since Deuticke (1930) observed that there exists a close relationship between the concentration of cozymase and that of hexosephosphate for the optimal reaction, the next experiment was carried out with the author's preparation to assure this point.

Namely, the concentration of candiolin was kept constant and that of the suprarenal extract was varied.

The reaction system consists of 1.0 cc. of beef heart emulsion, 1.0 cc. of M/5000 methylenblue, 1.0 cc. of 0.5 percent candiolin (used in a state of suspension) and 1.0 cc. of the suprarenal extract of various concentration, as given in Table VI, where the experimental results are summarised.

TABLE VI.

Concentration of suprarenal extract added	Decolorization time
10.0000 %	5' 0"
5.0000	4' 30"
2.5000	3' 50"
1.2500	3' 15"
0.6250	3' 30"
0.5000	3' 40"
0.2500	6' 30"
0.1250	17' 30"
0.0625	120' 0"
0.0313	>120' 0"
0.0156	∞

The above table reveals clearly, that in the experimental condition as applied here the optimal concentration of the suprarenal extract is 1.25 percentage, and in the concentration higher than this the reaction is rather retarded.

The chemical nature of the suprarenal extract.

From the above experimental result the substance seems to have a fair resemblance to the cozymase. According to Lohmann the cozymase is adenylypyrophosphate.

The qualitative tests of pentose and phosphor were positive with the author's preparation.

Also the quantitative analysis gave the following result. Here phosphor was determined by Lohmann's method, pentose by Hoffman's method and nitrogen by micro-Kjeldahl.

TABLE VII.

	Substance taken for analysis	Found	%	Cozymase (Euler) %
Nitrogen	10.0 mg.	0.557 mg.	5.57	11.95
Pentose	200.0	31.200	15.60	17.20
Total P	0.5	0.039	7.80	4.82

The pyrophosphate fraction of the total P was determined by Lohmann's method, namely the increase of inorganic phosphor after boiling with HCl of 1 normal concentration was measured. But no such increase was observed, leading to the conclusion that the suprarenal extract contains no pyrophosphate.

DISCUSSION.

The carbohydrate metabolism in the animal body has been much clarified in its concern to the energetics of muscle contraction.

It is fully confirmed, that glycogen is broken down to lactic acid anaerobically, and when oxygen is supplied, a portion of this lactic acid is further oxidised and the energy liberated there is used for resynthesis of glycogen from the rest of lactic acid. But the change from glycogen to lactic acid, or vice versa, can take place only through the intermediate phase of hexosephosphoric ester. This substance was first isolated from muscle by Embden (1914) and identified as glucosemonophosphoric acid ester (1927).

Kodama has also isolated from beef heart a similar substance, which is quite responsible for the reduction of the tissue acting as a powerful hydrogen donator in the sense of Wieland (1912-14). The substance was named biozucker and the ferment con-

cerned, biozucker dehydrogenase.

According to the author's experiment this ferment is found in nearly all organs, and is especially abundant in the suprarenal cortex and the heart muscle. The fact that the heart muscle contains much of the ferment can be easily understood because here glycogen is used up most briskly as a sole source of contraction energy. This stands also in good agreement with the assumption that the biozucker dehydrogenase plays an important rôle in the chemical process accompanying the muscle contraction.

The behaviour of the suprarenal gland is, however, very difficult to understand, because from the energetic point of view in comparison with the heart muscle the organ plays a minor rôle and need not require so much of the ferment. Therefore, the idea that this organ produces some coenzymatic substance which accelerates the action of the ferment, is more convincing. This was substantially proved, the evidence being furnished, that the suprarenal cortex contains much of the substance which does not serve alone as a donator at all, but when added to the biozucker or candiolin, the reduction of methylenblue by the tissue dehydrogenase occurs most intensely.

SUMMARY.

1. Distribution of biozucker dehydrogenase in various tissues was studied.
2. The suprarenal cortex contains codonator which accelerates the action of biozucker dehydrogenase.
3. The method of extraction of this codonator from the tissue was described.
4. Some resemblance of this substance to adenylypyrophosphate was discussed.

REFERENCES.

- Deuticke (1930): *Zs. f. phys. chem.*, **192**, 193.
Embden (1914): *Zs. f. phys. chem.*, **93**, 1.
Embden (1927): *Zs. f. phys. chem.*, **167**, 114.
Euler (1928): *Ann. d. Chem.*, **464**, 56.
Euler (1929): *Zs. f. phys. chem.*, **184**, 163.

- Hoffman, W. S. (1927): Jl. of biolog. chem., **73**, 15.
 Lohmann (1928): Biochem. Zs., **194**, 306.
 „ Biochem. Zs. **202**, 470.
 Lohmann (1929): Die Naturwissenschaften, 17 Jg., 624.
 Wieland (1912): Ber. d. dtsh. chem. Ges., **45**, 484.
 „ (1913): Ber. d. dtsh. chem. Ges., **46**, 3327.
 „ (1914): Ber. d. dtsh. chem. Ges., **47**, 2085.

STUDIES IN BIOLOGICAL REDUCTION.

III. The Redox-potential of Biozucker Plus its Dehydrogenase.

BY

MINORU TSUKANO.

(From The Laboratory of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University, Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, February 20, 1932)

In the foregoing communication an active donator isolated from the heart of ox was found as a hexosephosphoric acid. Since however, the ultimate constitution of this compound was not identified as Embden's (1927) or Robison's (1923-24) ester, it was simply called biozucker. This compound can reduce methylen-blue freely with the dehydrogenase in the heart muscle. For this communication, it was decided to measure the reduction intensity of the biozucker plus heart muscle potentiometrically.

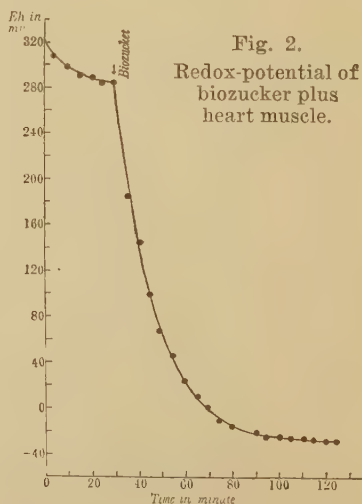
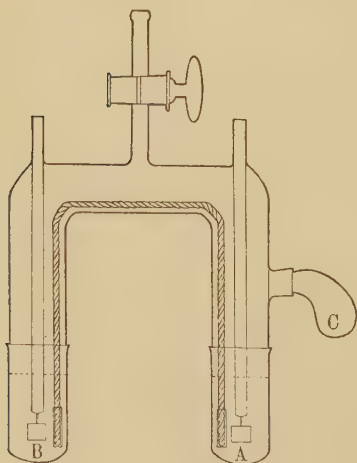
The heart muscle used in this experiment was prepared from beef heart. A portion of ventricular muscle was minced by putting it through a masticator, washing it thoroughly with water and preserving it in 60 percent glycerin. An aliquot portion of this muscle was squeezed between filter papers just before use, weighed and made into paste in a mortar with sea sand. To this M/15 phosphate buffer (pH=7.38) was added to make 10 percent emulsion of the muscle. This muscle emulsion alone was proved not to reduce the methylenblue in Thunberg's tube.

The biozucker used in this experiment was prepared as described by Kodama in the foregoing paper. It was made into 2 percent watery solution. For the determination of the reduction potential, the vacuum electrode vessel of Kodama and Dixon was used as shown in Fig. 1. Since this apparatus was not yet published some details of it are given here. The electrode was made of pure gold plate of the dimension (0.5×0.5 cm), which

through platin wire was connected with the glass tube filled with mercury for external conductance. For the half element the quin-hydron electrode was used (B) The electrode-vessel A and B was tightly connected with the body by grind-joint. The connection of both electrodes was realised by means of a thick cotton string, impregnated with KCl-agar. Both ends of the string were covered with a piece of glass-tube in order to prevent broad contact with the solution.

Into the reaction vessel, (A), 5.0 cc. of the heart muscle emulsion was introduced and into the side compartment (C), 2.0 cc. of 2 percent biozucker solution. After the connection between two electrodes was ensured by means of an agar salt bridge, the whole vessel was completely evacuated by use of a vacuum-pump, and then was immersed in a thermostat regulated at 37°C. When the contents reached the temperature of the thermostat, E. M.F. of this chain was measured with the Leed and Northrup's potentiometer (Type K) every 5 minutes. When this attained to constant value, the side compartment was overturned and its content was emptied, mixed well by shaking, and the following change in the potential was traced. As the control similar experiment with

Fig. 1.



heat-denatured heart muscle was performed. One of the typical results is given in Fig. 2. Since, as the solvent for quinhydron the acetate buffer of $\text{pH}=4.62$ was used, the potential of the reference-electrode was 415 mv. at the temperature of 37°C . The observed potential was, therefore, recalculated into Eh by adding this value.

It is apparent from the above result that the reduction potential increased upon the addition of the biozucker solution. After 80 minutes it almost reached $\text{Eh}-30$. This can be interpreted in the usual way, namely, that hydrogen in biozucker molecule was activated by the dehydrogenase of the heart muscle. In the control experiment no such change was observed.

It will be concluded from this result that the biological reduction system (heart muscle plus biozucker) exhibits reduction intensity nearly corresponding to the 99% reduction of methylen-blue.

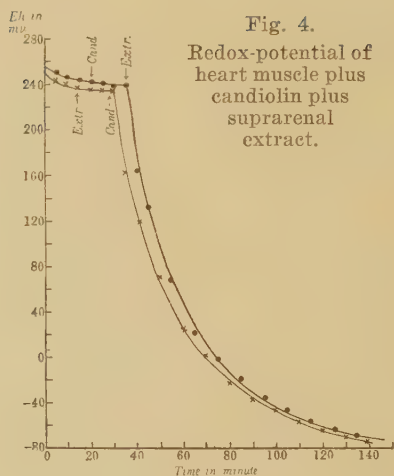
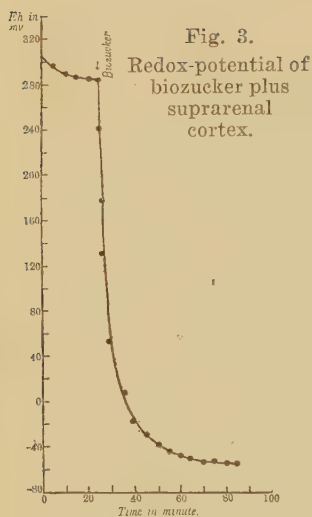
A similar experiment was repeated with 10 percent suprarenal cortex emulsion. The result is illustrated in Fig. 3. As was anticipated from the result of the foregoing communication, the reduction intensity is fairly strong, attaining $\text{Eh}-60$ mv. in this case.

The codonator nature of the extract of the suprarenal extract also can be as well demonstrated by the potentiometric method. In this case, the electrode vessel with two side-compartments was used.

Into the main compartment, 5.0 cc. of 10 percent heart muscle emulsion was introduced, into one side-compartment 2.0 cc. of 1.0 percent candiolin and into another, 2.0 cc. of 0.5 percent suprarenal cortex extract. When the heart muscle alone attained a constant value the candiolin suspension was poured into it, but the potential remained constant. Finally suprarenal extract was added, at which an abrupt drop of the potential ensued. In this case Eh attained was nearly -80 mv. The same is the case when suprarenal extract was added first, showing that the extract alone gives no reduction potential. The results are illustrated in Fig. 4.

SUMMARY.

The reduction potential of the system 1) heart muscle + bio-



zucker, 2) suprarenal cortex+biozucker and 3) heart muscle + candiolin+suprarenal cortex extract were studied.

REFERENCES.

- Embden (1927): Zs. f. phys. chem., **167**, 114.
Robison (1923-24): Bioch. Jl., **17**, 286; **18**, 740.

STUDIES IN BIOLOGICAL REDUCTION.

IV. The Reduction of Cystine by the Biological Reducing System.

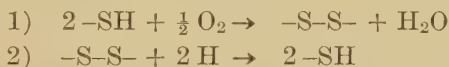
By

MINORU TSUKANO.

(From The Laboratory of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University, Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, February 20, 1932)

Since the discovery of glutathion by Hopkins (1921), the sulfhydryl compound has aroused much interest among many investigators of its role as oxidation catalyser in cell respiration. Here it seems to act as follows:



The first process, namely, the oxidation of the sulfhydryl compound, can be catalised by a minute trace of iron. Or it may be catalised in a cell by "Atmungsferment" as pictured by Warburg (1928), or perhaps by cytochrom of Keilin (1929).

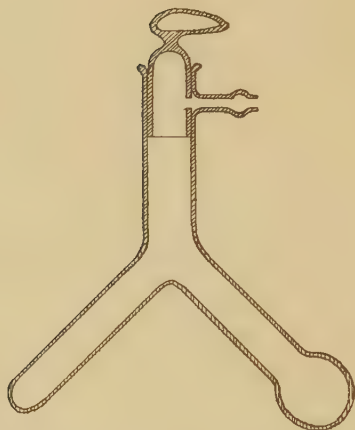
As to the second reduction phase, it has been proved by Hopkins and Dixon (1922) that this can be performed by fresh tissue with ease at a given acidity and temperature. It remains, however, undecided what system may actually bring about this reduction.

I. REDUCTION BY THE BIOZUCKER SYSTEM.

As was described in the previous report, the heart muscle and biozucker system exhibits a fairly strong reducing intensity. It was, therefore, investigated to decide whether or not this system could bring about the reduction of cystine to cysteine. The experiment was carried out as follows:

The reaction vessel used in this experiment is sketched in Fig. 1. Into the main compartment were introduced 5.0 cc. of

Fig. 1.



heart muscle emulsion, 2.0 cc. of 2.0 percent biosugar solution and 1.0 cc. of M/100 cystine solution, and into the side compartment 1.0 cc. of 2 mol. sulfosalicylic acid. The former two were prepared as mentioned in the foregoing communication. The cystine solution was prepared by dissolving the required amount in a small amount of N/50 NaOH, followed by neutralising to pH=8.0 by HCl, and then diluted with a sufficient amount of water so to make the endconcentration of cystine to M/100 per litre.

After evacuating for 5 minutes at a pressure of 5 mm. of mercury by means of a vacuum-pump, the apparatus was put into a thermostat kept at 37°C. At the lapse of 15–30 minutes the content of the side compartment was mixed with that of the main compartment in order to check the further action of the enzyme and at the same time to interrupt the reoxidation of the reduced cysteine when it came into contact with air.

The determination of the cysteine was carried out by the electrometric titration as described by Yamasaki (1930). The titration fluid here used was M/1000 KJO₃ solution, containing hydrochloric acid in the concentration of 2 percentage. 1.0 cc. of this solution corresponds to 1.0 cc. of M/1000 cysteine solution at this acidity. The actual procedure of the titration ran as follows:

2.0 cc. of the clear filtrate, which was obtained by filtering off

the precipitate due to sulfosalicylic acid, was pipeted into a small cylinder flask and mixed with 2.0 cc. of 5 percent HCl and 1.0 cc. of M/10 JK solution. This whole solution was titrated with the above KJO_3 solution from microbiuret at the room temperature.

The control experiment was carried out with utmost care, because the heart muscle emulsion and biozucker alone may contribute some titrable substance in a slight degree. Moreover, attention was paid to the possible occurrence of the reduction of cystine in the absence of biozucker. As the first control, therefore, the cystine solution in the above experiment was replaced by water, and as the second, the biozucker solution was replaced by water. A few of the results are summarised in Table I.

TABLE I.
The reduction of cystine to cysteine.

	10% heart emulsion	2% bio- zucker	M/100 cystine	Aq.
Reacting system.	a) 5.0 cc.	2.0 cc.	1.0 cc.	0 cc.
	b) 5.0	0	1.0	2.0
	c) 5.0	2.0	0	1.0

No. of experi- ment	Reacting system	Reaction time	KJO_3 solution used for titration	Increased KJO_3 solution	Cysteine produced
1	a)	30	0.63 cc.	0.32 cc.	0.0387 mg.
	b)	30	0.31		
	c)	30	0		
2	a)	60	0.54	0.34	0.0411
	b)	60	0.20		
	c)	60	0		
3	a)	15	1.89	1.89	0.228
	b)	15	0		
	c)	15	0		

Though each experiment does not show a concordant result in the amount of produced cysteine due to the activity of ferment and biozucker, yet it is obvious that the biological reducing system, heart muscle emulsion plus biozucker, can reduce cystine to cysteine

in an unmistakable manner. The qualitative test of cysteine with sodium nitroprussid could also give confirmation to the above experimental result.

II. INFLUENCE OF pH UPON THE REDUCTION OF CYSTINE TO CYSTEINE BY THE BIOZUCKER SYSTEM.

Hopkins and Dixon (1922) state that the reduction of oxidised glutathion by fresh tissue takes place most intensely at $\text{pH}=7.4$, and the reduced one is autooxidizable in solution more alkaline than $\text{pH}=7.0$.

As it seems very likely that the biozucker system may be responsible for the reducing ability of fresh muscle tissue, the effect of pH upon the production of cysteine by the biozucker system was studied.

The experimental procedures were the same as those of the foregoing one, except that here the heart muscle emulsion, buffered to different pH by phosphate mixture (M/15), was used.

The results are indicated in Table II, where the average values of three determinations are given.

TABLE II.
The effect of pH upon the reduction of cystine by the
biozucker system.

pH	5.59	6.46	6.81	7.16	7.38	7.70
Cysteine produced in mg.	0.059	0.067	0.078	0.078	0.084	0.068

The above table shows clearly that the optimal pH of the reduction due to the biozucker system is 7.38, which stands in agreement with the observation of Hopkins and Dixon, already referred to.

III. THE REDUCTION OF CYSTINE BY OTHER BIOLOGICAL REDUCING SYSTEMS.

Since the memorable work of Thunberg (1909) the succino-dehydrogenase is considered to be one of the most active reducing

agents of biological interest. It is interesting, therefore, to investigate how far this system can bring about the reduction of cystine to cysteine.

For the sake of comparing the result with that of the biozucker system, the same experimental procedure as that of the foregoing experiment was followed, except that instead of biozucker, 2.0 cc. of M/20 sodium succinate solution was used. The results are given in Table III.

TABLE III.
The reduction of cystine to cysteine by the succinodehydrogenase system.

		10% heart emulsion	M/100 cystine	M/20 sodium succinate	Aq.
Reacting system.	{ a)	5.0 cc.	1.0 cc.	2.0 cc.	0 cc.
	{ b)	5.0	1.0	0	2.0
Reaction time		15 minutes.	Reaction temperature		37°C.

No. of experi- ment	Reacting system	KJO ₃ solution used for titration	Increased KJO ₃ solution	Cysteine produced
1	a)	0.62 cc.	0.10 cc.	0.0121 mg.
	b)	0.52		
2	a)	0.60	0.12	0.0145
	b)	0.48		
3	a)	0.78	0.30	0.0363
	b)	0.48		

It is obvious from the above table that cystine can be reduced by the succinodehydrogenase system. In this case, however, reduction occurs in a less degree than in the case of the biozucker system. Moreover, the content of succinate in fresh tissue is presumably less than biozucker, so that we may conclude that the active dehydrogenating agent in fresh tissue, which is responsible for the reduction of cystine or glutation, is biozucker dehydrogenase. It may also be inferred that other donators, such as hypoxanthin, acetoaldehyd and lactic acid, were proved to be completely inactive in this concern.

CONCLUSION.

Evidence was given that biozucker system can bring about the reduction of cystine to cysteine. It was also proved that succino-dehydrogenase can reduce cystine, though in a less degree.

REFERENCES.

- Hopkins (1921): *Bioch. Jl.*, **15**, 286.
Hopkins and Dixon (1922): *Jl. of biolog. chem.*, **54**, 527.
Keilin (1929): *Proc. Roy. Lond.*, **104**, 206.
Thunberg (1909): *Skand. Arch. Phys.*, **22**, 430.
Warburg (1928): *Die Naturwissenschaften*, 16 Jg. H. 20, 345.
Yamasaki (1930): *The Jl. of Biochem.*, **12**, No. 2, 207.

INDEX TO VOLUME XV.

A

- α -alanine, The isoelectric point of glycocoll and — 345.
- ABE, M., YOSHIMURA, K. and TADOKORO, T. On the physico-chemical differences between α -, β -, γ -hemoglobins. (Second Report) 197.
- ARAI, Yoshi. The behaviour of methylglyoxal in weak alkaline solution. 151.
- Atrophancholereze, Über die —. 115.

B

- Bebrütung, Über das Verhalten der Fette bei der — von Hühneriern. 319.
- Bebrütung, Über das Verhalten des Ovovitellins bei der — des Meerschildkröteneies. 325.
- Biological reduction, Studies on —, 473, 477, 487, 491.
- Biozucker-dehydrogenase, Distribution of — in various tissues, with special reference to the coenzymatic action of the extract of suprarenal cortex. 477.
- Blockierung, Über die Beziehung zwischen Gallensäuresekretion und — des retikuloendothelialen Systems. 129.
- Blood, On the method of preventing coagulation of the — without any change in its corpuscular volume. 331.
- Blood sugar, A note on the Hagedorn-Jensen's method of — determination in case of phlorhizin diabetes. 311.
- Blut, Über den physiologischen Brom-

- gehalt des —es und dessen Beeinflussung durch Menstruation und perorale Bromzufuhr. 205.
- Blut, Über eine Mikromethode zur Bestimmung des wahren Zuckergehaltes im —. 427.
- Blut-Gallensäure, Beiträge zur Bestimmung der —n. 399.
- Bromgehalt, Über den physiologischen — des Blutes und dessen Beeinflussung durch Menstruation und perorale Bromzufuhr. 205.
- Bromstoffwechsel, Klinische und experimentelle Untersuchungen über —. 205.

- Bromzufuhr, Über den physiologischen Bromgehalt des Blutes und dessen Beeinflussung durch Menstruation und perorale —. 205.

C

- Cholezystographie, Gallensekretion bei der — mittels des Tetraiodphenolphthaleinnatriums mit besonderer Berücksichtigung der Gallensäuresekretion. 219.
- Coenzymatic action, Distribution of biozucker-dehydrogenase in various tissues with special reference to the — of the extract of suprarenal cortex. 477.
- Corpuscular volume, On the method of preventing coagulation of the blood without any change in its —. 331.
- Cystin contents, On the — of human hair. II. 257.
- Cystin, The reduction of — by the biological reducing system. 491.

D

- Dehydrogenase, The redox-potential of biozucker plus its ——. 487.
- Dor, Niroichi. Über eine Mikromethod zur Bestimmung des wahren Zuckergehaltes im Blut. 427.

E

- Embryochemie, Beiträge zur — der Reptilien. 325.
- Endokinen Drüsen, Über den Einfluss der Funktion der —n — auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 65.

F

- Fette, Über das Verhalten der — bei der Bebrütung von Hühner-eiern. 319.
- FUKASE, Takahiko und FUJIWARA, Kanzi. Über die Gallensäurebildung. V. Über den Einfluss der Nahrung auf den Gallensäuregehalt der Galle. 193.
- FUJIWARA, Kanji, FUKASE, Takahiko. Über die Gallensäurebildung. V. Über den Einfluss der Nahrung auf den Gallensäuregehalt der Galle. 193.
- FUJIWARA, Kanzi. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XIII. Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure und inneren-sekretorische Hormon. 181.

G

- Galle, Über den Einfluss der Nahrung auf den Gallensäuregehalt der —. 193.
- Gallenfistelhunde, Der Einfluss des Gallenverlustes auf die Zuckertoleranz beim —. 381.

- Gallensäure, Bedeutung der — im Kohlehydratstoffwechsel. 167, 381.
- Gallensäure, Über die Zuckerassimilation durch —. 359, 373.
- Gallensäurebildung, Über die —. 193.
- Gallensäuregehalt, Über den Einfluss der Nahrung auf den — der Galle. 193.
- Gallensäuren-Bestimmung, Über die — im Urin durch Stalagmometrie. 413.
- Gallensäurensekretion, Über die Beziehung zwischen — und Blockierung des retikuloendothelialen Systems. 129.
- Gallensäurenstoffwechsel, Studien über den —. 115, 129.
- Gallensäuresekretion, Gallensekretion bei der Cholezystographie mittels des Tetrajodphenolphthaleinnatriums mit besonderer Berücksichtigung der —. 219.
- Gallensekretion bei der Cholezystographie mittels des Tetrajodphenolphthaleinnatriums mit besonderer Berücksichtigung der Gallensäuresekretion. 219.
- Gallenverlustes, Der Einfluss der — auf die Zuckertoleranz beim Gallenfistelhunde. 381.
- Gesamtcholesteringehalt, Beitrag zur Kettnis des Einflusses der Lichtstrahlen auf den — der Haut. 111.
- Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure und das vegetative Nervensystem. 167.
- Goldhydrosol, Über den Einfluss der Nichteletkrolyte auf die Koagulation des —. 163.
- Guinea pig, On sulphur metabolism of — —s fed on a Vitamin C free diet. 285, 301.

H

H₂-donator, A preliminary note on the chemical nature of an active — from heart muscle. 473.

Hair, On the cystin contents of human —. II. 257.

Haut, Beitrag zur Kenntnis des Einflusses der Lichtstrahlen auf den Gesamtcholesteringehalt der —. 111.

Heart muscle, A preliminary note on the chemical nature of an active H₂-donator from —. 473.

Hematocrit method, A note on the — modified by Sahli. 339.

Hemoglobins, On the physico-chemical differences between α -, β -, and γ —. (Second Report). 197.

HIRAKI, Magoji. A note on the hematocrit method modified by Sahli. (Studies on the corpuscular volume of the blood. II.). 339.

HIRAKI, Magoji. On the method of preventing coagulation of the blood without any change in its corpuscular volume (Studies on the corpuscular volume of the blood. I.) 331.

HIRAKI, Magoji. The isoelectric point of glycocoll and α -alanine. 345.

Hormone, Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure und innersekretorische —. 181.

Hühnereiern, Über das Verhalten der Fette bei der Bebrütung von —. 319.

Human hair, On the cystin contents of —. II. 257.

Hydrolysis, On the — of nucleic acid, nucleotides and nucleosides. 261.

I

Isoelektric point, The — — of glykocoll and α -alanine. 345.

K

KAMEO, T. Über den Einfluss der Leberschädigungen auf die Serumlipase. 229.

Katarakt, Experimentelle Untersuchungen über das Linseneiweiss bei —. 33.

KAWAGUCHI, S. Beitrag zur Kenntnis des Einflusses der Lichtstrahlen auf den Gesamtcholesteringehalt der Haut. 111.

KAWAI, Kenkichi und SUYEYOSHI, Juji. Studien über die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Lecithins (Erste Mitteil.) 277.

Kleinphosphoesterase, Über die —. 1, 11.

KOBAYASHI, Yeitaro. On the hydrolysis of nucleic acid, nucleotides and nucleosides. 261.

KODAMA, K. Studies on biological reduction. I. A preliminary note on the chemical nature of an active H₂-donator from heart muscle. 473.

KOH-solution, A revision of the article "On the O₂ absorption velocity of NaOH and —. 29.

Kohlehydratstoffwechsel, Bedeutung der Gallensäure im —. 167.

Kohlenhydratstoffwechsel, Die Bedeutung der Gallensäure im —. 381.

KURANAMI, Teikichi. Klinische und experimentelle Untersuchungen über Bromstoffwechsel. I. Über den physiologischen Bromgehalt des Blutes durch Menstruation und perorale Bromzufuhr. 205.

KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Bestimmung der Blut-Gallensäure. I.

Mitteilung. Kritik der Methode von Aldrich. 399.

KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Embryochemie der Reptilien. IX. Über das Verhalten des Ovovitellins bei der Bebrütung des Meerschilddrüsenes. 325.

KUSUI, Kenzo. Über das Verhalten der Fette bei der Bebrütung von Hühnereiern. 319.

L

Leberschädigung, Über den Einfluss der —en auf die Serumlipase. 229.

Lecithin, Studien über die physikalisch-chemischen Eigenschaften des —s. (Erste Mitteil.). 277.

Lichtstrahlen, Beitrag zur Kenntnis des Einflusses der — auf den Gesamtcholesteringehalt der Haut. 111.

Linseneiweiss, Experimentelle Untersuchungen über das — bei Katarakt. 33.

M

MASAKI, Kiyoshi. A revision of the article "On the O_2 absorption velocity of NaOH- and KOH-solution. 29.

Meerschilddrüse, Über das Verhalten des Ovovitellins bei der Bebrütung des —es. 325.

Menstruation, Über den physiologischen Bromgehalt des Blutes und dessen Beeinflussung durch — und perorale Bromzufuhr. 205.

Methylglyoxal, The behaviour of — in weak alkaline solution. 151.

MIKAMI, Hisashi. Gallensekretion bei der Cholezystographie mittels des Tetraiodphenolphthaleinnathiums mit besonderer Berücksichtigung

der Gallensäuresekretion. 219.

MIKAMI, Hisashi. Studien über den Gallensäurenstoffwechsel. VI. Über die Beziehung zwischen Gallensäuresekretion und Blockierung des retikuloendothelialen Systems. 129.

MIKI, Toshio. Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XII. Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure und das vegetative Nervensystem. 167.

Mikromethode, Über eine — zur Bestimmung des wahren Zucker gehaltes im Blut. 427.

MISAWA, Hiroshi. Chemische Untersuchungen über das Vitamin B_1 . 439.

N

NaOH-, A revision of the article "On the O_2 absorption velocity of — and KOH-solution. 29.

Nervensystem, Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure und das vegetative —. 167.

Nichtelektrolyte, Über den Einfluss der — auf die Koagulation des Goldhydrosol. 163.

Nucleic acid, On the hydrolysis of — —, nucleotides and nucleosides. 261.

Nucleosides, On the hydrolysis of nucleic acid, nucleotides and —. 261.

Nucleotides, On the hydrolysis of nucleosides. 261.

O

O_2 absorption, A revision of the article "On the — — velocity of NaOH- and KOH-solution. 29.

OHATA, Shinsuke. On sulphur metabolism of guinea pigs fed on a Vitamin C free diet. 285, 301.

- OHO, T., YOSHINARE, T. und TAKEDA, M. Über die Gallensäuren-Bestimmung im Urin durch Stalagmometrie. 413.
- Ovovitellins, Über das Verhalten des — bei der Bebrütung des Meerschildkröteneies. 325.

P

- Phlorhizin diabetes, A note on the Hagedorn-Jensen's method of blood sugar determination in case of —. 311.
- Phosphodiesterase, Über die Phosphomonoesterase und die —. 19.
- Phosphomonoesterase, Über die — und die Phosphodiesterase. 19.
- Physico-chemical differences, On the — between α -, β - and γ -hemoglobins. (Second Report). 197.
- Physikalisch-chemischen Eigenschaften, Studien über die — des Lecithins (Erste Mitteil.) 277.
- Physiologischen Bromgehalt, Über den — des Blutes und dessen Beeinflussung durch Menstruation und perorale Bromzufuhr. 205.

R

- Redox-potential, The — of biozucker plus its dehydrogenase. 487.
- Reptilien, Beiträge zur Embryochemie der —. 325.
- Retikuloendothelialen Systems, Über die Beziehung zwischen Gallensäurensekretion und Blockierung des —. 129.

S

- Sahli, A note on the hematocrit method modified by —. 339.

- SAKAMOTO, Isamu. Studien über den Gallensäurestoffwechsel. V. Über die Atophancholerese. 115.
- Scurvy, Studies in experimental —. 285, 301.

- Serumlipase, Über den Einfluss der Leberschädigungen auf die —. 229.

- Stalagmometrie, Über die Gallensäuren-Bestimmung im Urin durch —. 413.

- SUEYOSHI, Yuji und KAWAI, Kenkichi. Studien über die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Lecithins (Erste Mitteil.) 277.
- Sulphur metabolis, On — of guinea pigs fed on a Vitamin C free diet. 285, 301.

T

- TADOKORO, T., ABE, M. and YOSHIMURA, K. On the physico-chemical differences between α -, β - and γ -hemoglobins. (Second Report). 197.
- TADOKORO, Tetsutaro and UGAMI, Hanako. On the cystin contents on human hair. II. 257.
- TAKEDA, M., OHO, T. und YOSHINARE, T. Über die Gallensäuren-Bestimmung im Urin durch Stalagmometrie. 413.
- TANAKA, Toshiyuki. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel. XXII. Der Einfluss des Gallenverlustes auf die Zuckertoleranz beim Gallen fistelhunde. 381.
- Tetrajodphenolphthaleinnatrium, Gallensekretion bei der Cholezystographie mittels des —s mit besonderer Berücksichtigung der Gallensäuresekretion. 219.
- Tissues, Distribution of biozucker-dehydrogenase in various —,

with special reference to the co-enzymatic action of the extract of suprarenal cortex. 477.

TSUJI, Taiki. Experimentelle Untersuchungen über das Linseneiweiss bei Katarakt. 33.

TSUKANO, Minoru. Studies on biological reduction.

II. Distribution of biozucker-dehydrogenase in various tissues, with special reference to the coenzymatic action of the extract of suprarenal cortex. 477.

III. The redox-potential of biozucker plus its dehydrogenase. 487.

IV. The reduction of cystine by the biological reducing system. 491.

TSUTSUI, Hikoya. Über den Einfluss der Nichteletrolyte auf die Koagulation des Goldhydrosol. 163.

U

UGAMI, Hanako and TADOKORO, Tetsutaro. On the cystin contents of human hair II. 257.

Urin, Über die Gallensäuren-Bestimmung im — durch Stalagmometrie. 413.

UZAWA, Schuichi. Über die Kleienphosphoesterase. 1, 11.

UZAWA, Schuichi. Über die Phosphomonoesterase und die Phosphodiesterase. 19.

V

Vitamin B₁, Chemischen Untersuchungen über das —. 439.

Vitamin C, On sulphur metabolism of guinea pigs fed on a — free diet. 285, 301.

Y

YAMADA, Susumu. A note on the Hagedorn-Jensen's method of blood sugar determination in case of phlorhizin diabetes. 311.

YOKOTA, Soitiro. Über den Einfluss der Funktion der endokrinen Drüsen auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 65.

YOSHIMURA, K., ABE, M. and TADOKORO, T. On the physico-chemical differences between α -, β - and γ -hemoglobins. (Second Report). 197.

YOSHINARE, T., OHO, T. und TAKEDA, M. Über die Gallensäuren-Bestimmung im Urin durch Stalagmometrie. 413.

YUUKI, Hideo. Über die Zuckerassimilation durch Gallensäure. 359, 373.

Z

Zuckerassimilation, Über die — durch Gallensäure. 359, 373.

Zuckerausscheidungsschwelle, Über den Einfluss der Funktion der endokrinen Drüsen auf die —. 65.

Zuckergehalt, Über eine Mikromethode zur Bestimmung des wahren —es im Blut. 427.

Zuckertoleranz, Der Einfluss des Gallenverlustes auf die — beim Gallen fistel hunde. 381.